



TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTUDIO DE FACTORES IMPLICADOS
EN LOS MECANISMOS DE
VIRULENCIA DE VIRUS TIPO IPNV**

María del Carmen Lago Lorenzo

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN AVANCES EN BIOLOXÍA MICROBIANA E PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE
ESTUDIO DE FACTORES IMPLICADOS EN LOS MECANISMOS DE VIRULENCIA DE VIRUS
TIPO IPNV

D./Dna. MARÍA DEL CARMEN LAGO LORENZO

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 23 de Xullo de 2020

Asdo.



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE
ESTUDIO DE FACTORES IMPLICADOS EN LOS MECANISMOS DE VIRULENCIA DE VIRUS
TIPO IPNV

D./Dna. Carlos Pereira Dopazo

INFORMA/N:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. **María del Carmen Lago Lorenzo**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 23 de Xullo de 2020.

Asdo.



DECLARACIÓN DE INTERESES

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.



En Santiago de Compostela, 23 de Xullo de 2020

Asdo.



AGRADECIMIENTOS

El destino ha querido que me haya tocado hacer este apartado en tiempos de pandemia. El confinamiento y los cambios bruscos que nos ha tocado vivir con toda esta situación, el estar reclusa en casa y privada de todos esos “privilegios” en lo que a la vida social se refiere, te hacen pensar en la vida, en su recorrido, y darle valor a cada cosa que te haya tocado vivir en cada momento, y mucho más aún, darle valor a todas y cada una de las personas con las que en un momento u otro de tu vida, te ha tocado convivir. Mis más sinceras GRACIAS a todas y cada una de ellas, pues de todas ellas he aprendido algo.

Empiezo dando gracias a mi familia, porque lo son todo para mí, y hoy en día soy lo que soy gracias a ella. Este trabajo, y todos mis logros en la vida, os los debo a vosotros. ¡Esto ha sido un trabajo en equipo! Mención especial a mi padre, que por desgracia, hoy no puede compartir esta victoria conmigo; pero no hace falta tenerlo a mi lado para saber lo orgulloso que se siente, y por eso le dedico este trabajo.

Gracias, como no, a David, mi compañero de vida; en lo sentimental, por ser el pilar que sostiene mi mundo, e incluso en lo profesional, que su trabajo ha tenido con esta tesis.

A mis amigos, mil gracias. Desde aquellos que se mantienen a mi lado desde la infancia, a los que han pasado por mi vida durante mi carrera y años de laboratorio, a aquellos con los que comparto fiestas y cañas, o los que me acompañan en el ámbito laboral. Sin su fuerza y apoyo, nada habría sido posible.

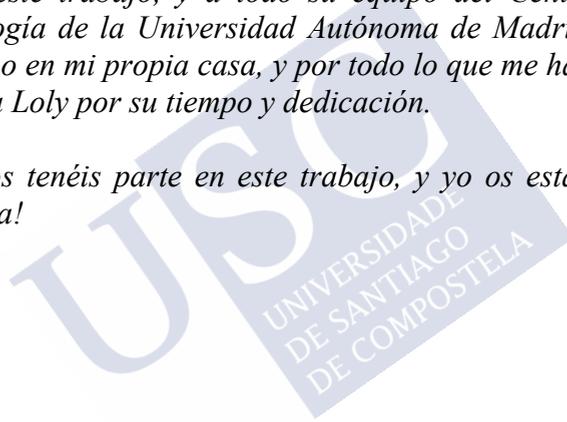
En cuanto a este trabajo se refiere, gracias a Carlos e Isa por darme la oportunidad de formar parte de vuestro grupo y marcarme el camino a seguir. Sobre todo a Carlos, director de esta tesis, por su trabajo, su esfuerzo y su paciencia. A todos mis compañeros de laboratorio, por su colaboración en este trabajo, y sobre todo por haber sido parte de esa familia, con la que he compartido los mejores y peores momentos de mi vida. ¡Siempre os estaré agradecida! A Alián,

Carmen, Dolores, Diego, Javi, Juanma, Jony, Noeliña, Placeres Susana y las dos Sandras, por su ayuda, pero sobre todo por todos sus momentos de tertulia y apoyo moral. También a otros compañeros que han pasado de manera fugaz por el laboratorio, pero que han puesto su granito de arena; especialmente a Adrián por su gran trabajo.

A los compañeros del Intituto de Acuicultura, como Arturo, Bea, Sol, Amable, Nuria, Natalia, Miguel, Carlos, Juan, Alicia, Manuel...y muchos más, con los que he compartido grandes momentos y me han brindado su ayuda en más de una ocasión. A Raquel y a Miro por los grandes ratos que compartimos en microscopía electrónica.

Gracias también a Jose Francisco Rodríguez (Paco) por formar parte de este trabajo, y a todo su equipo del Centro Nacional de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Madrid, por hacerme sentir como en mi propia casa, y por todo lo que me han enseñado. En especial, a Loly por su tiempo y dedicación.

¡Todos tenéis parte en este trabajo, y yo os estaré eternamente agradecida!



RESUMEN

El crecimiento que ha experimentado la acuicultura en los últimos años, ha llevado a un más intenso movimiento de animales vivos, lo que, unido a factores, como el ambiental, ha acelerado la dispersión de enfermedades. El control de enfermedades virales conlleva la elaboración de vacunas y tratamientos eficaces, lo que a su vez requiere del conocimiento en profundidad de sus factores de virulencia. Por ello, el trabajo de esta tesis se centró en el estudio de los factores de virulencia de birnavirus acuáticos, una de las familias virales que generan mayores pérdidas en acuicultura, con el fin de conocer su funcionamiento y sus mecanismos de adaptación al hospedador. Para ello, hemos abordado el trabajo en tres etapas, organizadas en tres capítulos. El primero de ellos enfocado en analizar la presencia, en muestras propias, de determinantes de virulencia ya descritos, y comprobar su implicación en la virulencia. En el segundo, tratamos de confirmar la implicación del *reassortment* en la virulencia y entender la dinámica del intercambio y encapsidación de segmentos durante la replicación. El último capítulo se centra en la búsqueda de poliploidía en cepas de birnavirus acuáticos y su posible implicación en la virulencia. Con ello, hemos podido demostrar que la virulencia de birnavirus acuáticos parece estar regulada por un compendio de factores que interactúan al mismo tiempo y no parece depender únicamente de los residuos aminoacídicos presentes en las proteínas virales. Hemos observado, además, que el *reassortment* está implicado en la regulación de la virulencia, suponiendo un mecanismo de adaptación al hospedador, favoreciendo la persistencia del virus, y que este proceso no ocurre al azar, sino que es un fenómeno dirigido y parece depender del tipo celular. Por último, hemos demostrado la presencia de poliploidía en este tipo de virus, y observado que este fenómeno también podría estar relacionado con la virulencia, al menos *ex vivo*.



ABSTRACT

In the last decade, aquaculture has experienced a significant boom, involving a bigger movement of live animals, which, together with other factors like environment, have speeded up the spreading of diseases. Control of viral diseases requires the development of effective vaccines and treatments, which at the same time, requires a deep knowledge of its virulence factors. For that reason, this thesis was focused on the study of the virulence factors of aquatic birnaviruses, one of the main viral families causing losses in aquaculture, with the aim of achieving a better knowledge of their behavior and adaptation mechanisms to the host. We organized this study in three headlands distributed in three different chapters. The first one, focused on the analysis of virulence factors already reported by other authors, and their implication in virulence. The second one, focused on the existence of reassortment in aquatic birnaviruses, and on the analysis of the dynamics of segment exchange; again, its implication in virulence. Finally, the third chapter was focused on the study of the presence of polyploidy in this kind of viruses and its effect in virulence. Results demonstrated that aquabirnavirus virulence seems to be regulated by a set of factors interacting at the same time, and not depending only on the aminoacidic sequence of its proteins. We also observed that reassortment is involved on the virulence regulation, meaning a persistence mechanism in the host. This is not a random process, but it is a directed phenomenon and seems to depend on cell type. Finally, we demonstrate the existence of polyploidy in aquatic birnaviruses and its implication on virulence, at least *ex vivo*.



ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
ÍNDICE	7
INTRODUCCIÓN	11
Familia <i>Birnaviridae</i>	12
Birnavirus acuáticos	13
Organización genómica	14
Estructura y proteínas estructurales.....	15
Ciclo de replicación.....	22
Clasificación.....	23
Patología.....	25
Factores de virulencia.....	27
OBJETIVOS	31
CAPÍTULO 1: DETERMINANTES DE VIRULENCIA EN LA SECUENCIA GENÓMICA	33
1.1 Introducción	33
1.2 Materiales y métodos	36
1.2.1 Líneas celulares y titulación viral.....	36
1.2.2 Cepas virales.....	37
1.2.3 Secuenciación	37
1.2.4 Diseño de cebadores	37
1.2.5 Amplificación de fragmentos genómicos.....	40
1.2.6 Purificación de fragmentos amplificados	40
1.2.7 Reacción de secuenciación	41
1.2.8 Análisis de las secuencias.....	41
1.2.9 Replicación diferencial de cepas de birnavirus acuáticos	42
1.3 Resultados	42

1.3.1	Secuenciación genómica <i>de novo</i>	42
1.3.2	VP5 las distintas cepas	44
1.3.3	Análisis de la secuencia de aa en las regiones de VP2 relacionadas con la virulencia	46
1.3.4	Análisis de los residuos de VP1 relacionados con la virulencia	48
1.3.5	Replicación diferencial	50
1.4	Discusión.....	51
CAPÍTULO 2: REASSORTMENT.....		57
2.1	Introducción.....	57
2.2	Materiales y métodos.....	59
2.2.1	Líneas celulares, cepas virales y titulación viral	59
2.2.2	<i>Reassortment in vitro</i>	60
2.2.3	Análisis estadístico	63
2.2.4	Replicación diferencial <i>ex vivo</i>	64
2.2.5	Replicación diferencial <i>in vivo</i>	64
2.2.6	Detección y aislamiento viral a partir de tejido.....	66
2.3	Resultados	68
2.3.1	Porcentajes de <i>reassortment</i> tras la coinfección.....	68
2.3.2	Análisis estadístico	71
2.3.3	Infectividad <i>in vitro</i>	75
2.3.4	Infectividad <i>in vivo</i> de cepas recombinantes aisladas de peces salvajes.....	81
2.3.5	Infectividad <i>in vivo</i> de recombinantes obtenidos por el proceso de coinfección-clonación	83
2.4	Discusión.....	84
CAPÍTULO 3: POLIPLOIDÍA.....		91
3.1	Introducción.....	91
3.2	Materiales y métodos.....	92
3.2.1	Líneas celulares y cepas virales.....	92
3.2.2	Titulación viral	93
3.2.3	Purificación viral	93
3.2.4	Análisis del contenido genómico de las fracciones F3-F6 94	
3.2.5	Análisis del contenido proteico de las fracciones F1-F6 94	

3.2.6	Microscopía electrónica.....	95
3.2.7	Infección experimental	96
3.2.8	Detección viral a partir de muestras de tejido	97
3.2.9	Purificación viral a partir de tejido de peces infectados...	99
3.3	Resultados	100
3.3.1	Composición de las fracciones virales en CsCl.....	100
3.3.2	Análisis del contenido proteico de las fracciones F1-F6..	102
3.3.3	Análisis de la composición genómica de las fracciones F1-F6	103
3.3.4	Tamaño de las partículas de las fracciones F3-F6.....	104
3.3.5	Replicación <i>in vitro</i>	107
3.3.6	Virulencia <i>in vivo</i>	107
3.3.7	Análisis de las fracciones obtenidas por purificación de virus a partir de tejido	109
3.4	Discusión.....	111
	CONCLUSIONES	129
	BIBLIOGRAFÍA	131
	PERMISOS FIGURAS	151
	ANEXO.....	155



INTRODUCCIÓN

Los virus son entidades simples con complejas estrategias que les proporcionan capacidad adaptativa y modulan su virulencia. Además de las distintas estructuras capsidales, existe una gran variedad de organizaciones genómicas. La mayoría de los virus conocidos poseen un genoma de RNA, que a su vez puede ser monocatenal o bicatenal y de polaridad negativa o positiva. Los virus DNA también pueden ser mono- o bicatenales, y algunos de ellos pueden incluso alternar entre RNA y DNA en las distintas fases de su ciclo.

Su gran variabilidad genética se la aportan tres mecanismos evolutivos muy activos en este tipo de entidades: las mutaciones en la secuencia genómica, la recombinación génica y el *reassortment* (que implica el intercambio de segmentos genómicos completos, en virus con genomas segmentados) (Wei y col., 2006). Esta característica es la que hace que, de entre las enfermedades infecciosas que afectan a peces, sean las de origen viral las de mayor trascendencia, ya que su elevada variabilidad genética dificulta el desarrollo de tratamientos y métodos de prevención efectivos, causando así elevadas mortalidades.

De entre todas las familias virales, son los virus RNA los que poseen una mayor capacidad adaptativa, debido al pequeño tamaño y a la sencillez de sus genomas, pero sobre todo, a la falta de acción correctora de las RNA polimerasas. Por el contrario, los virus DNA poseen genomas más grandes y complejos, que se mantienen más estables debido a la elevada fidelidad de sus enzimas de replicación (con excepción de los virus DNA monocatenal).

Las principales familias virales que afectan a peces son: *Adenoviridae*, *Iridoviridae* y *Herpesviridae* dentro de las de genoma DNA, y *Birnaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramixoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Retroviridae*, *Nodaviridae*, *Reoviridae* y *Togaviridae* entre los virus RNA.

La familia *Birnaviridae* es el objeto de estudio de nuestro trabajo, y más concretamente el género *Aquabirnavirus*, cuya especie tipo es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), agente etiológico de enfermedades infecciosas que afectan a distintas especies de peces marinos y cultivados. Estos virus son patógenos conocidos por provocar grandes pérdidas en acuicultura, fundamentalmente en salmónidos, aunque también han sido aislados de otras especies tanto marinas como de agua dulce. Debido a su elevada variabilidad genética, son capaces de replicar en un amplio rango de hospedadores, causando distintas patologías, por lo que debe hacerse una diferenciación entre los aislados de salmónidos que causan la patología clásica (virus tipo IPNV), y los aislados de no salmónidos, que deben considerarse birnavirus acuáticos o acuabirnavirus, al menos, hasta que exista evidencia de que causan necrosis pancreática (Hill y Way, 1995).

Debido a las características epidemiológicas y la elevada diversidad de los birnavirus acuáticos, no existen tratamientos terapéuticos ni vacunas preventivas eficaces. Para desarrollar una vacuna efectiva es imprescindible establecer e identificar los factores de virulencia del patógeno, siendo éste el motivo principal para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral.

FAMILIA *BIRNAVIRIDAE*

El nombre de esta familia fue aprobado por el Comité Internacional de Taxonomía Vírica (ICTV) en el año 1986, con el virus IPNV como especie tipo. Este nombre hace referencia a la naturaleza genómica del virus, ya que el prefijo “birna” se debe a su genoma de RNA bicatenal bisegmentado.

Esta familia comprende cuatro géneros diferentes, relacionados con el tipo de hospedador (Dobos y col., 1979; Murphy y col., 1995; Delmas y col., 2018):

-*G. Avibirnavirus*: La especie tipo de este género es el virus de la bursa de los pollos (IBDV) (Cheville, 1967), enfermedad que afecta a aves y distribuida a nivel mundial.

-*G. Entombirnavirus*: La única especie dentro del género es el virus X de *Drosophila* (DVX), que fue aislado por primera vez en 1979 en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Dobos y col., 1979),

aunque su rango de hospedadores es más amplio y puede afectar a otros tipos de insectos.

-*G. Aquabirnavirus*: Constituye el grupo más grande de esta familia. La especie tipo es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), pero también incluye otros virus que afectan a peces, como el de la ascitis del medregal del Japón (YAV), y los virus de tellina (TV) y de ostra (OV), siendo ambos de moluscos bivalvos. Causan necrosis pancreática infecciosa en salmónidos, incluyendo miembros de los géneros *Salmo*, *Salvalinus* y *Oncorhynchus*, y branquionefritis en anguilas. El virus ha sido asociado también a enfermedades en otras especies de peces, moluscos y crustáceos cultivados y salvajes de todo el mundo.

-*G. Blosnavirus*: Este es el último género descrito en esta familia e incluye virus que infectan a peces de la especie cabeza de serpiente (snake head, *Channa maculata*).

BIRNAVIRUS ACUÁTICOS

Las primeras descripciones de birnavirus acuáticos surgen con el descubrimiento de la necrosis pancreática infecciosa (Wood y col., 1955), enfermedad sistémica contagiosa que afecta principalmente a salmónidos salvajes y cultivados. Esta enfermedad provoca un nivel de mortalidad inversamente proporcional a la edad, siendo muy frecuente en peces jóvenes (causando altas tasas de mortalidad en alevines) y rara en adultos, donde la enfermedad es prácticamente inaparente, y actuando los individuos supervivientes como portadores asintomáticos.

El virus IPNV se aisló por primera vez en 1958, siendo el primer virus de peces cultivado *in vitro* (Wolf y col., 1959); aunque la cepa que luego se consideraría como cepa tipo, se aisló en 1960 en una epidemia en trucha arcoiris en Leetown (Virginia), siendo depositada en la ATCC (American Type Culture Collection) y designada como VR-299. Desde entonces, tanto el virus como la patología asociada han ido extendiéndose por todo el mundo; de este modo, virus IPNV -o tipo IPNV- han sido aislados a partir de una gran variedad de animales poiquilotermos, incluyendo peces salmónidos, no salmónidos, moluscos y crustáceos (Hill, 1982). Su temperatura de replicación se encuentra entre 4 y 27,5 °C (Scherrer y col., 1974), con la óptima

alrededor de 15 °C; además, se ha demostrado que el virus tolera incluso la temperatura de animales homeotermos (Sonstegard y col., 1972). Al tratarse de un virus desnudo, es muy resistente a solventes lipídicos y a temperaturas y pH extremos. La demostrada estabilidad de estos virus en ambientes naturales, tanto de agua dulce como marina, facilita enormemente su transmisión (Desautels y MacKelvie, 1975; Toranzo y Metricic, 1982).

Organización genómica

El genoma, de unos $4,8 \times 10^6$ Da, constituye entre un 9 y un 10% del peso total de la partícula, que es de alrededor de 55×10^6 Da (Dobos y col., 1977a). Se trata de RNA de doble cadena, formado por dos segmentos independientes de alrededor de $3,0 \times 10^3$ Da y $2,6 \times 10^3$ Da (segmentos A y B, respectivamente) (Moss y Gravell, 1969; Cohen y col., 1973; Dobos y col., 1977a).

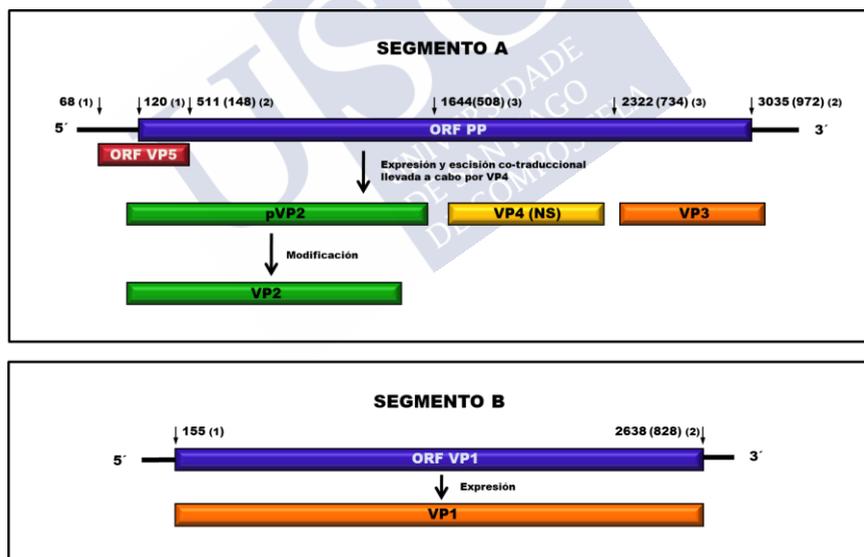


Figura 1. Organización genómica de IPNV. El segmento A contiene dos ORFs: el primero de ellos, codifica la proteína no estructural VP5 y el segundo, la poliproteína, que sufre una modificación co-traduccional mediante la actividad autoproteásica de la región la VP4 de la poliproteína, originando las proteínas pVP2, VP3 y VP4. El segmento B tiene un único ORF que codifica la proteína VP1. (1) Posiciones de los ORF. (2) Final de las regiones codificantes. (3) Puntos de corte de la proteasa NS (VP4).

El segmento A, de unas 3000 pb, es bicistrónico; contiene dos pautas de lectura abierta (ORFs) solapadas (Figura 1). La menor se encuentra en el extremo 5' del segmento y codifica una proteína no estructural de 17 kDa, la VP5 (Magyar y Dobos, 1994; Heppell y col., 1995a). El segundo ORF, el mayor y más conocido, codifica la poliproteína PP, de 106 kDa (NH₂-pVP2-NS-VP3-COOH), la cual es precursora de las proteínas estructurales VP2, NS (VP4) y VP3 mediante modificación cotraduccional gracias a la actividad proteolítica de la región NS (VP4) (Figura 1). Los puntos de corte en la poliproteína se localizan en las posiciones Ala-Ser 508-509 y 734-735 (según la secuencia de VP4 de la cepa Sp con código de acceso U56907); además, se han encontrado dos puntos de corte adicionales para VP2 entre dos alaninas, en posiciones 495-496 y 486-487 (secuencia U56907) (Petit y col., 2000; Imajoh y col., 2007). La secuencia de este segmento (más concretamente de la región VP2) determina el serotipo del virus, habiéndose demostrado, además, su relación con el tropismo celular y la virulencia del virus (Sano y col., 1992; Santi y col., 2004).

El *segmento B*, el más pequeño de los dos, formado por 2748 nucleótidos en la cepa Jasper, posee un único ORF que codifica la polimerasa viral de 94 kDa conocida como VP1, y que puede encontrarse en forma de polipéptido libre (VP1) o covalentemente unida al extremo 5' de ambos segmentos genómicos (VPg) (Figura 1). Este segmento es el más conservado de los dos y la mayoría de las mutaciones que se producen en él no implican cambios aminoacídicos (Shwed y col., 2002; Zhang y Suzuki, 2003).

Estructura y proteínas estructurales

IPNV es un virus icosaédrico, desnudo, con un diámetro de entre 55 y 74 nm, aunque el tamaño más frecuente es de 60 nm (Lightner y Post, 1969; Moss y Gravell, 1969). Su cápside está formada por 132 capsómeros y su arquitectura se describe, al igual que la de la mayoría del resto de virus icosaédricos, por el principio de cuasiequivalencia propuesto por Caspar y Klug (1962), siendo su número de triangulación T=13.

El virión está constituido por cuatro tipos de proteínas estructurales que se han denominado de VP1 a VP4 (Cohen y col., 1973; Dobos y

col., 1977; Dobos y Rowe, 1977; Chang y col., 1978; Hedrick y col., 1983) (Figura 2A).

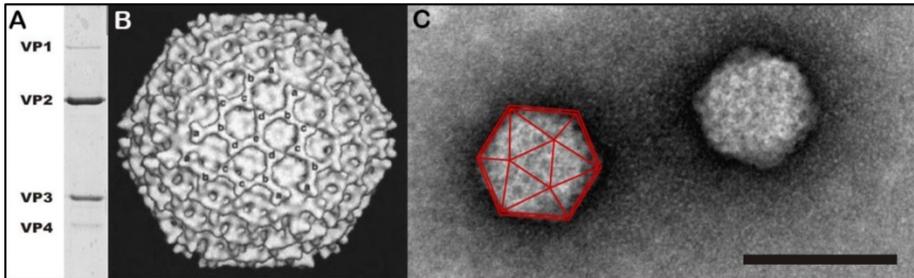


Figura 2. Estructura de la cápside de birnavirus y proteínas estructurales. **A.** Proteínas estructurales del virión: VP1 (94 kDa), VP2 (54 kDa), VP3 (31 kDa) y VP4 (29 kDa). **B.** Estructura tridimensional de la partícula con la distribución de los distintos tipos de trímeros (Castón y col., 2001). **C.** Imagen de microscopía electrónica de virus purificados (escala 100 nm). [Imagen B tomada de “C Terminus of Infectious Bursal Disease Virus Major Capsid Protein VP2 Is Involved in Definition of the T Number for Capsid Assembly” (Castón y col. 2001)(permiso de la editorial)].

Bötcher y col. (1997) proponen un modelo estructural para la cápside de birnavirus basado en criomicroscopía, equivalente para IPNV e IBDV. En él se propone que la proporción de las distintas proteínas en la cápside sería 51% de VP2, 40% de VP3, 6% de VP4 y solo un 3% de VP1. La parte externa de la cápside estaría formada por 780 subunidades de VP2 organizadas en 260 trímeros, que se dividen en cinco clases dependiendo de su localización (denominados de “a” a “e”), (Figura 2B). Los trímeros tipo “a” se encuentran en los ejes de simetría 5 de la partícula; los tipo “e”, en los ejes de simetría 3, y están en contacto con los tres trímeros vecinos (tipo “d”); los trímeros tipo “c” se encuentran en los ejes de simetría 2; y por último, los “b” establecen contactos entre tres trímeros próximos. En este modelo, la proteína VP3 podría encontrarse en la cara interna de la cápside, o bien en su interior interactuando con el RNA. Este modelo fue posteriormente reproducido por Castón y col. (2001), confirmando que la cara interna de la cápside está formada por VP3, quien actúa de intermediario entre VP1 y VP2. En ambos modelos se describe la aparición de poros en la superficie de la cápside, poros que algunos

autores sugieren que pueden usarse para la extrusión del RNA recién sintetizado (Garriga y col., 2006).

1. *Proteína VP1*

La proteína VP1, la de mayor tamaño (94 kDa), es la RNA polimerasa viral y representa el 4% de las proteínas del virión. Se encuentra en forma libre o ligada al genoma mediante un enlace serina-5'GMP fosfodiéster (denominada entonces VPg) (Persson y Macdonald, 1982; Calvert y col., 1991) y se ha sugerido que es su extremo C' terminal el que puede interactuar con el RNA, debido a su alto contenido en aminoácidos básicos (Duncan y col., 1991). Es una proteína globular que alterna regiones hidrofílicas e hidrofóbicas y que sigue la conformación típica de las RNA polimerasas RNA dependientes (RdRps) (Figura 3) que recuerda a una mano derecha con sus dominios palma, pulgar y dedos (Kohlstaedt y col., 1992; O'Reilly y Kao, 1998; Butcher y col., 2001).

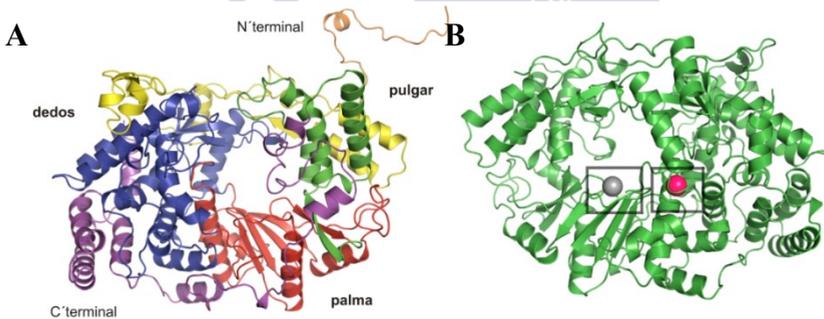


Figura 3. Estructura de VP1. A. Representación de una molécula de VP1, con los dominios palma en rojo, pulgar en verde y dedos en azul. También se indican los extremos amino terminal (N') y carboxilo terminal (C'). B. Representación esquemática de la interacción con los iones de Mg⁺² en la región del centro activo (rojo) y K⁺ entre los dominios de palma y dedos. [Imagen tomada de "The N-Terminus of the RNA polymerase from infectious pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment" (Graham y col., 2011)(permiso de la editorial)]

Sin embargo, esta polimerasa difiere de las canónicas en que no posee, en la región de la palma, el dominio Gly-Asp-Asp (GDD), que se cree que es un elemento esencial para el centro activo (Duncan y col., 1991; Shwed y col., 2002) y que el número de iones Mg⁺² en el centro activo

es inferior al de otras RdRps (solo un ión). Otra característica de esta polimerasa es que posee en su extremo N' los motivos de unión a NTP típicos de las proteínas de unión a GTP tipo Ras, lo que puede representar un punto de auto-guanilación, proceso esencial para la unión al genoma mediante el enlace serina-5'GMP fosfodiéster (Duncan y col., 1991; Graham y col., 2011). Esta unión permite que la VP1 actúe como *primer* para la replicación, sintetizando una cadena sencilla de RNA (-) copia del dsRNA, en una sola ronda de replicación (Xu y col., 2004). Esta proteína es capaz de interactuar consigo misma, con el RNA y además con la proteína VP3. Esta doble interacción podría estar relacionada con el inicio de la traducción del RNA, además de con su encapsidación, como ha sido descrito recientemente en su homólogo IBDV (Ye y col., 2017).

2. *Proteína VP2*

Es la proteína mayoritaria de la cápside (representa el 62% del virión). Su tamaño es de 54 kDa, y es la proteína contra la que se dirigen los anticuerpos neutralizantes específicos y que actúa como proteína de fijación específica a las células. Se sintetiza en forma de una molécula precursora pVP2, que es escindida por la proteasa NS (VP4) originando la proteína VP2 madura y tres péptidos pequeños (Nobiron y col., 2008); estos parecen estar relacionados con la formación de poros en la membrana celular, por lo que pueden participar en la entrada en la célula (Galloux y col., 2007). Esta proteína está constituida por tres dominios: el dominio base (B) está formado por hélices α , amino y carboxilo terminales que tapizan el interior de la cápside; los dominios armazón (S) y protuberante (P) son láminas β orientadas tangencialmente (S) y perpendicularmente (P) a la superficie de la cápside, siendo este último el dominio que constituye las espículas (Figura 4C).

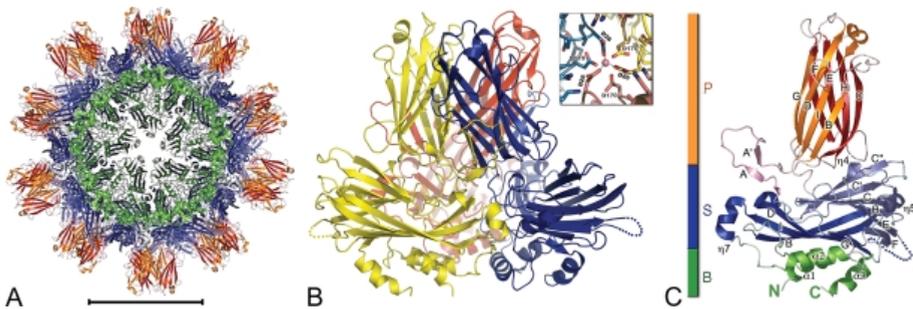


Figura 4. Estructura de VP2. A. Representación de una SVP, partícula formada únicamente por VP2. En la imagen se representan en verde los dominios base (B), en azul armazón (S) en rojo el protuberante (P). Escala 100 nm. B. Trímero de VP2 con los protómeros en distintos colores. En el recuadro se muestra la interacción con el ión de Co^{+2} . C. Molécula de VP2 con los tres dominios diferenciados por colores (B: verde, S: azul y P: rojo). [Imagen tomada de “Crystal structure of an Aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism” (Coulibaly y col., 2010)(permiso de la editorial)]

Las moléculas de VP2 se organizan en torno a un ión metálico (Co^{+2} en IPNV, Ca^{+2} en IBDV) que se sitúa entre los dominios S y B, dando así estabilidad al trímero (Coulibaly y col., 2010), (Figura 4B). Los contactos entre trímeros se producen de dos maneras (Figura 4A): por contactos laterales entre los dominios S y P en los ejes de simetría de orden 2 y 5, y por intercambio molecular de la hélice α entre trímeros adyacentes a lo largo del eje de simetría 2 (Garriga y col., 2006).

Entre los dominios S y P se encuentra un surco muy conservado en cuya base se encuentra un dominio de unión a integrina $\alpha 4\beta 1$ que en su homólogo IBDV resulta esencial para la unión a la superficie celular (Delgui y col., 2009).

Esta proteína está sometida a gran presión evolutiva, causa de la gran heterogeneidad en la región genómica codificante, y está relacionada con la virulencia. Se han identificado una serie de residuos (217, 221 y 247) relacionados con la virulencia, de los cuales los residuos 217 y 221 pueden estar relacionados con la fijación específica a la célula y el establecimiento de persistencia (Sano y col., 1992; Heppell y col., 1995b; Blake y col., 2001; Santi y col., 2004; Coulibaly y col., 2010). Estos residuos forman clústeres en la región de las espículas (dominio P) (Coulibaly y col., 2010).

3. *Proteína VP3*

Esta proteína de 31 kDa es de ubicación interna, aunque diversos estudios sugieren que una pequeña secuencia aminoacídica puede estar expuesta en la superficie, y puede estar implicada en la génesis de determinados anticuerpos monoclonales (Caswell-Reno y col., 1986; Tarrab y col., 1993; Park y Jeong, 1996). Interacciona consigo misma, con el dsRNA y con la proteína VP1. Estas múltiples propiedades de interacción sugieren que VP3 está involucrada en la replicación y el empaquetamiento del genoma viral (Pedersen y col., 2007; Ye y col., 2017).

El dominio de unión a VP1 se encuentra en sus 62 aminoácidos carboxilo-terminales (C'). La unión VP1-VP3 se produce en ausencia de RNA. Los complejos formados por estas dos proteínas se detectan antes de la formación de las partículas virales, por lo que se cree que pueden estar implicados en el ensamblaje de la partícula; además, estos complejos interactúan con el RNA, secuestrándolo durante el ensamblaje (Pedersen y col., 2007; Bahar y col., 2013). VP3 interactúa con el RNA por ambos extremos; así, los complejos RNA-VP3-VP1 constituyen ribonucleoproteínas filamentosas que forman una estructura tipo "core" como la que existe en otros virus y que protege al RNA (Hjalmarsson y col., 1999).

VP3 también interactúa consigo misma por el extremo amino-terminal (N'). Esta interacción convierte a VP3 en una proteína de andamiaje que contribuye a la unión de capsómeros pVP2-VP2. Estudios en IBDV demuestran que la proteína pVP2 posee una hélice anfipática en su extremo C', que actúa como un interruptor molecular determinando el ensamblaje de los trímeros de pVP2 en pentámeros o hexámeros dependiendo de la interacción con VP3 (Oña y col., 2004; Luque y col., 2007).

4. *Proteína VP4 o NS*

Originalmente denominada NS (no estructural), es una proteasa autocatalítica escindida postraduccionalmente de la poliproteína, que va a procesar a esta para originar VP2 y VP3 (Manning y col., 1990). Esta proteína se encarga, además, del corte proteolítico de pVP2 para originar la proteína VP2 madura. Petit y col.

(2000) sugieren que esta proteína pertenece a la superfamilia de las serín proteasas, con el motivo señal de corte en las regiones pVP2-VP4 y VP4-VP3 Ser/Thr-X-Ala-Ser/Ala.

Además de su actividad proteasa, la VP4 se ha relacionado con la supresión de los mecanismos de inmunidad del huésped (Lauksund y col., 2015).

5. *Proteína VP5*

Esta proteína, de 17 kDa, se ha detectado en células infectadas pero no en viriones purificados y no se expresa en todas las cepas (Heppell y col., 1995a).

Su función aún no es bien conocida. Diversos autores la incluyen dentro de la familia de las proteínas Bcl-2, siéndole atribuidas propiedades tanto pro-apoptóticas (Hong y col., 2002; Lin y col., 2005) como anti-apoptóticas (Santi y col., 2005a). Se ha demostrado, además, que es dispensable para la replicación del virus y no interviene en la virulencia ni en el establecimiento de persistencia (Santi y col., 2005b).

Más recientemente, en el caso de la VP5 de IBDV, se ha visto que es una proteína dispensable para los procesos básicos de la replicación y que puede estar relacionada con el proceso de liberación no lítica del virus, afectando a su diseminación (Méndez Hernández, 2018).

La mayoría de las proteínas de birnavirus acuáticos, con excepción de VP1, tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune del huésped, favoreciendo la replicación viral. Pre-VP2, VP3, VP5 y especialmente VP4, parecen actuar sobre los factores de señalización de la ruta que activa el promotor de interferón (IFN), molécula que ejerce un papel esencial en la respuesta inmune innata en peces, disminuyendo por lo tanto la respuesta inflamatoria. VP1, por el contrario, y al igual que el RNA viral, induce la activación de la transcripción de IFN, activando la respuesta inmune en el huésped (Lauksund y col., 2015). Así, el balance de citoquinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, cuya síntesis es promovida por los componentes estructurales del virus, es el que determina el resultado de la infección (si se produce una infección aguda o persistente) (Reyes-Cerpa y col., 2012).

Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de este tipo de virus dura de 16 a 20 h (Malsberger y Cerini, 1965). En un primer paso, el virus se adhiere a la célula a través de la proteína VP2, de manera específica o inespecífica, a polipéptidos de la membrana plasmática que actúan como receptores del virus; estos receptores varían en función del hospedador (Ørpetveit y col., 2012). Coulibaly y col. (2010), basándose en la estructura de VP2, sugieren incluso la necesidad de dos receptores distintos en IPNV, uno para la adsorción, situado en la espícula o dominio protuberante, y otro de internalización, presente en el surco conservado de esta proteína. Esta interacción favorece el ingreso del virus en la célula por endocitosis, al igual que otros virus sin envuelta. Inmediatamente después de la adsorción, se observan partículas virales en el citoplasma celular, dentro de compartimentos vesiculares endosomales periféricos de pH ácido, o vesículas cubiertas por clatrina (Couve y col., 1992). Luego, el ácido nucleico se libera desde el endosoma al citosol, donde tiene lugar la replicación.

Según Espinoza y Kuznar (1997), el pH ácido endosomal no influye en el proceso de entrada al citoplasma celular; sin embargo, Rodríguez Saint-Jean y col. (2003) sugieren que podría tener una función dual durante la infección, por un lado, induciendo cambios en la estructura del virión para favorecer la decapsidación, y por otro, aportando el gradiente necesario como fuente de energía para la traslocación viral desde el endosoma o la superficie celular hacia el citosol.

Tras la entrada en la célula, la RNA polimerasa se activa y empieza a replicar el RNA genómico. A las dos horas post-infección (p.i.), se detecta un intermediario de transcripción; los RNA mensajeros se empiezan a detectar en la célula 4-6 h tras la infección (p.i.) y se sintetizan en la misma proporción durante todo el ciclo (Cortez-San Martín y col., 2009). Simultáneamente a los RNAm se detectan las proteínas virales, ya que la traducción comienza a las 3-4 horas post-infección, no habiendo separación de fase temprana y tardía. El dsRNA se detecta a las 7 horas, observándose un pico de producción entre las 8-10 horas (Somogyi y Dobos, 1980). Tan pronto como es sintetizado, el nuevo complejo VPg-RNA puede actuar como un complejo de

iniciación, promoviendo el ensamblaje y empaquetamiento del nuevo genoma. La proteína VP3 también puede intervenir en este proceso, estabilizando el genoma y regulando la interacción de pVP2 y VP2 para la organización de la cápside (Chevalier y col., 2002; Maraver y col., 2003).

Las partículas virales se ensamblan y acumulan en el citoplasma de las células infectadas simultáneamente a la replicación del genoma. No se conoce el mecanismo de liberación del virus, pero entre las 16 y 20 h p.i. los viriones maduros son liberados, originando un característico efecto citopático (ECP) en las células hospedadoras.

Clasificación

Hill y Way (1995) clasificaron los birnavirus acuáticos en dos serogrupos, denominados A y B, en base a resultados de seroneutralización cruzada con anticuerpos policlonales, y observando cierta relación entre los serotipos (que luego se confirmaría entre genotipos) y la distribución geográfica de las cepas.

Al serogrupo A, constituido por 9 serotipos (A1 a A9), pertenecen la mayoría de los birnavirus aislados; incluye cepas arquetipo aisladas en Norteamérica y Europa, la mayoría a partir de salmónidos, con excepción de A4 que afecta a lucio (*Esox lucius*) y A5 a bivalvos (*Tellina tenuis*). El serotipo A1, cuya cepa tipo es West Buxton (WB), incluye la mayoría de los aislados en Estados Unidos; los serotipos A2 a A5 se circunscriben principalmente a Europa y se corresponden con las cepas de referencia Sp, Ab, He (Hecht) y Te (Tellina); los serotipos A6 a A9 se encuentran principalmente en Canadá y sus cepas tipo de referencia son C1, C2, C3 y Ja (Jasper). Por otro lado, el serogrupo B, cuya cepa tipo es TV-1, es un grupo sencillo, con unos pocos aislados tanto en peces como invertebrados marinos de Europa. Los aislados de este grupo no son neutralizados por ninguno de los antisueros de referencia del grupo A.

Hay, además, una serie de aislados que no se pueden integrar en estos serotipos y que se denominan comúnmente MABV (marine birnavirus), lo que ha llevado a muchos autores a postular la existencia de un tercer serogrupo, e incluso un cuarto (Riji y Richards, 1999; Dixon y col., 2001).

Posteriormente, Blake y col. (2001) propusieron una nueva clasificación basada en las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas, mediante la secuenciación completa del segmento A. En ella, las distintas cepas de referencia, junto con una serie de aislados, se agrupan en 6 genogrupos. Dentro del primero de ellos, llegan a diferenciarse hasta 4 genotipos diferentes (Figura 5).

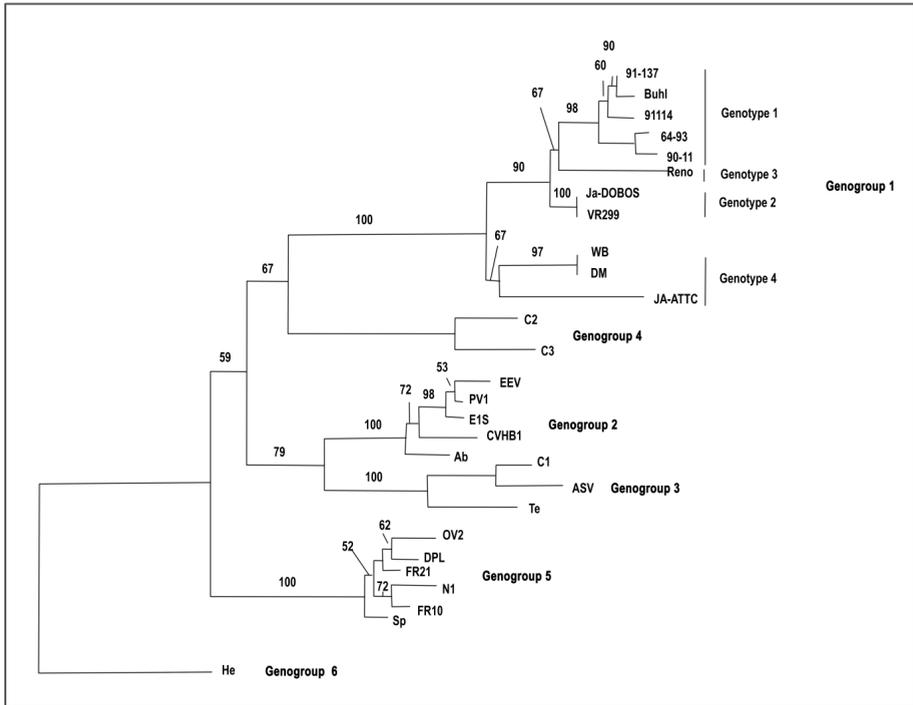


Figura 5. Clasificación genotípica de Blake y col. Cladograma representando las relaciones filogenéticas de birnavirus acuáticos propuesto por Blake y col., 2001. [Tomado de Blake y col., 2001(permiso de la editorial)].

Así, basándose en las similitudes en la región VP2, se definieron 6 genogrupos. En el genogrup 1 se encuentran los aislados americanos y la cepa Jasper (Ja), correspondiéndose con el serotipo A1. El genogrup 2 contiene aislados europeos y asiáticos y se corresponde con el serotipo A3. En el genogrup 3 se encuentran las cepas canadienses C1 y ASV pertenecientes al serotipo A6, y la cepa europea Te del serotipo A5. Otras cepas canadienses C2 y C3 (serotipos A7 y

A8 respectivamente) se agrupan en el genogrupo 4. En el genogrupo 5 se encuentran los miembros del serotipo A2, incluyendo cepas europeas y un aislado asiático. Por último, el genogrupo 6 está compuesto únicamente por la cepa He (serotipo A4).

Análisis posteriores realizados con cepas de MABV aislados de peces marinos describen la existencia de un séptimo genogrupo formado por aislados de peces y moluscos de Japón y Corea. En este genogrupo 7 se encuentra, además, la cepa de referencia YTAV (Yellowtail ascites virus) (Zhang y Suzuki, 2004; Nishizawa y col., 2005).

Patología

Aunque originalmente la patología provocada por IPNV se relacionó con peces salmónidos, se han encontrado virus tipo IPNV en más de una treintena de familias de peces, 11 especies de moluscos y 4 especies de crustáceos. También se ha descrito su aislamiento a partir de protozoos, e incluso se ha detectado por RT-PCR en zooplacton marino, postulándose su papel como reservorio. En general, replica en animales poiquiloterms, aunque se comprobó que el virus resiste la temperatura de homeoterms y puede ser transmitido a mamíferos a través de aves (Sonstegard y col., 1972; Eskildsen y Vestergard-Jorgensen, 1973).

IPNV es un virus altamente contagioso. La transmisión puede ser una combinación entre vertical y horizontal, por contacto con heces, orina o productos sexuales de peces infectados (Reno y col., 1978). El virus penetra a través de las branquias y la boca, o pasando también por los poros sensoriales del sistema de la línea lateral (Wolf, 1988; Novoa y col., 1995a). Bowers y col. (2008), detectaron replicación viral en las aletas pectorales tan solo 24 h post-infección, sugiriendo la base de la aleta como otra posible vía de entrada para IPNV, como ya se ha descrito en otros virus.

Los órganos de replicación temprana son el riñón anterior, los ciegos pilóricos, el hígado y el bazo (Shankar y Yamamoto, 1994), detectándose posteriormente en otros órganos y siendo en el páncreas donde se producen las principales lesiones, al menos, en salmónidos.

La necrosis pancreática infecciosa es la enfermedad de etiología viral reconocida como de mayor impacto en el cultivo de salmónidos a nivel mundial. La enfermedad varía desde inaparente o subclínica a virulenta, donde la mortalidad es elevada o incluso total; la primera indicación de una epidemia es la elevada mortalidad de los alevines. Los factores que determinan el nivel de gravedad de la enfermedad son la edad, el estado fisiológico del hospedador, la temperatura del agua y la variedad o cepa involucrada. La enfermedad se manifiesta externamente por una extrema delgadez de los individuos afectados, acompañada de exoftalmia moderada, distensión abdominal, frecuente presencia de hemorragias abdominales y pigmentación oscura con palidez en las branquias. Internamente, se observan hemorragias y petequias a través de la masa visceral, junto con palidez de riñones, hígado, corazón y bazo; el tracto digestivo aparece desprovisto de alimento y lleno de un fluido mucoso blanquecino procedente de la descamación intestinal (McKnight y Roberts, 1976). Los valores del hematocrito aparecen bajos (Wolf, 1988). En ocasiones, aparecen petequias en el tejido adiposo anterior y pueden aparecer ascites en la cavidad peritoneal.

La necrosis pancreática es, quizás, el signo más característico de la infección, pero los cambios histológicos se extienden a los tejidos renal, excretor y hematopoyético (Wolf y Quimby, 1971). Se ha observado, además, degeneración del músculo esquelético y cambios de comportamiento que llevan a la postración del pez y la natación errática, débil y lenta, describiendo una trayectoria en espiral.

Ellis y col. (2010), mediante un estudio histológico en salmón atlántico, propusieron, al igual que lo habían hecho con anterioridad Santi y col. (2005a), que el hígado es el principal órgano diana de IPNV y que el resultado de la infección (aguda o persistente) depende del balance de hepatocitos infectados al principio de la infección y la respuesta inmune del hospedador. Así, si al inicio de la infección hay un alto número de hepatocitos infectados, se inhibe la respuesta inmune del hospedador, por lo que las células periféricas son más sensibles a la infección y se desencadena apoptosis en respuesta a la presencia del RNA viral, llevando esto a un fallo hepático y a la muerte. Sin embargo, si el número de hepatocitos infectados al principio es bajo, se produce

el suficiente IFN para que la respuesta inmune en las células vecinas sea la suficiente para inhibir la replicación viral, impidiendo la apoptosis y promoviendo la recuperación, por lo que el individuo supera la infección. Estos autores también sugieren que el alto título viral en el riñón se debe a que el virus pasa de los hepatocitos infectados al torrente sanguíneo y por éste llegan al riñón, donde quedan concentrados en el retículo endotelial. Ahí, en la cabeza del riñón se establece una primera línea de defensa frente al virus y éste pasa a infectar los macrófagos; por eso se considera el principal órgano de detección del virus, incluso en individuos portadores asintomáticos (Julin y col., 2009).

Todos estos signos son típicos de alevines y juveniles tempranos afectados; peces de más de seis meses desarrollan síntomas subclínicos e infecciones inaparentes. Esto puede deberse a que en alevines y juveniles el hígado y el páncreas son metabólicamente más activos, lo que hace que el virus replique más rápido, o bien, a que los hepatocitos sean más sensibles al IFN favoreciendo la apoptosis en defensa a la infección; también podría ser porque en individuos jóvenes se expresan más receptores de IFN en hepatocitos y células acinares del páncreas, por lo que su efecto se ve incrementado, generando apoptosis en este tipo de células (Ellis y col., 2010). Los peces adultos pueden ser infectados por el virus, pero las mortalidades son bajas o inexistentes (Krogstad y Håstein, 1989; Ledo y col., 1990; Smail y col., 1992; Rivas y col., 1993). Por otro lado, los supervivientes de una infección pueden desarrollar una infección crónica y convertirse en portadores, difundiendo el virus dentro del agua vía heces, orina y productos sexuales (Yamamoto, 1975).

La mortalidad y los síntomas varían en función de la cepa y la especie del hospedador. En peces no salmónidos no provocan necrosis pancreática, pero sí necrosis en tejidos hematopoyéticos, así como en riñón y bazo (Novoa y col., 1995b). Esta es la característica clave para hacer diferenciación entre virus IPNV o tipo IPNV, entre los que se incluyen los birnavirus acuáticos y los “marine birnavirus”.

Factores de virulencia

Debido a las características epidemiológicas de IPNV y los birnavirus acuáticos en general, no existen tratamientos terapéuticos

eficaces, ni vacunas preventivas. La elevada variabilidad genética y el desconocimiento de todos los factores de virulencia de este tipo de virus son los principales hándicaps a la hora de desarrollar una vacuna efectiva.

Son muchos los estudios enfocados en el análisis de factores de virulencia de virus tipo IPNV, pero hasta el momento, los existentes asocian la virulencia del virus única y exclusivamente a la secuencia genómica de la región hipervariable del segmento A, y a residuos específicos de VP2 y la región VP2-NS.

Santi y col., (2004), mediante estudios de genética reversa, encontraron en la región de VP2 unos motivos que determinan la virulencia (y/o persistencia) en las posiciones 217, 221 y 247. Entre ellos, las combinaciones T (treonina)₂₁₇-A (alanina)₂₂₁ y P (prolina)₂₁₇-A (alanina)₂₂₁ se corresponden con fenotipos de alta y baja virulencia, respectivamente. En esos motivos, la combinación P₂₁₇-T₂₂₁ determina la persistencia y T₂₁₇-A₂₂₁ la virulencia. De entre estos dos residuos, 217 sería el principal determinante de la virulencia y 221 parece estar más relacionado con la adaptación al huésped, ya que se observó que tras varios pases por cultivo celular se produce un cambio de Ala a Thr, lo que implica atenuación. Posteriormente, Song y col. (2005), confirmaron que el establecimiento de persistencia se relaciona con el residuo 221, siendo T₂₂₁ el determinante de persistencia y A₂₂₁ el de virulencia. En 2013, varios autores vuelven a relacionar estos motivos con la virulencia/persistencia. Gadan y col. (2013) mediante mutaciones dirigidas en el residuo 221, observaron que mutando la combinación relacionada con la persistencia, T₂₁₇-T₂₂₁ a T₂₁₇-A₂₂₁, la cepa revertía a virulenta y además, tenía una mayor capacidad de fijación a la superficie celular. Mutoloki y col. (2013), asociaron las combinaciones T₂₁₇-A₂₂₁ y P₂₁₇-T₂₂₁ con infecciones clínicas y subclínicas, respectivamente.

A pesar de la clara relación de la virulencia con la secuencia de la región VP2, otros autores han propuesto otros posibles determinantes de la virulencia en estos virus. Shivappa y col. (2004), analizando la secuencia genómica del segmento A de tres aislados diferentes de la cepa Sp, encontraron que la proteína VP5 poseía dos posibles codones de iniciación y un codón de terminación prematuro, originando así tres

tipos posibles de VP5, la esperada de 17 kDa, y dos formas truncadas de 15 kDa y 12 kDa, y relacionaron las distintas formas de VP5 con cepas de alta y baja virulencia, respectivamente. Otros autores habían sugerido previamente la implicación de esta proteína en la virulencia, al detectar que algunas cepas no codificaban esta proteína y mostraban un bajo nivel de virulencia (Santi y col., 2004; Zhang y Suzuki, 2004). Posteriormente, otros autores demostraron que esta proteína no es esencial para la virulencia ni la persistencia del virus en el hospedador (Santi y col., 2005b).

Shivappa y col. (2004), en su caracterización de las distintas cepas de Sp, también encontraron 5 sustituciones aminoacídicas en VP1, y asociaron mutaciones en las posiciones 125, 154 y 240 con cepas de elevada y baja virulencia, sugiriendo la implicación de VP1 en la virulencia. Sí se ha demostrado el efecto de VP1 sobre la virulencia en IBDV (Hon y col., 2006; Le Nouën y col., 2006), pero hasta el momento no hay ningún trabajo en IPNV que pruebe su implicación.





OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis doctoral ha sido establecer e identificar los factores de virulencia de birnavirus acuáticos, para entender mejor el mecanismo de adaptación al hospedador. Para ello, hemos desglosado este objetivo primordial en los tres siguientes:

1. Analizar la presencia, en aislados propios, de los determinantes de virulencia descritos por otros autores y comprobar si existe una relación con los niveles de virulencia y capacidad replicativa de las cepas.
2. Confirmar la implicación del *reassortment*, o recombinación intermolecular, en la regulación de la virulencia de estos virus y determinar su frecuencia *ex vivo*. Al mismo tiempo, hemos querido estudiar el mecanismo de intercambio y encapsidación de segmentos durante la replicación.
3. Determinar la existencia de poliploidía en cepas salvajes de birnavirus acuáticos y analizar su posible implicación en la virulencia y capacidad replicativa del virus.



CAPÍTULO 1: DETERMINANTES DE VIRULENCIA EN LA SECUENCIA GENÓMICA

1.1 INTRODUCCIÓN

Tras la publicación de Sano y col. (1981), en la que se vinculaba la virulencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) al segmento A, multitud de autores han examinado la secuencia nucleotídica de este segmento, para determinar las diferencias en la secuencia aminoacídica que pueden justificar los distintos niveles de virulencia observados entre las distintas cepas de este virus. Los estudios de Bruslind y Reno (2000), Santi y col. (2004) y Shivappa y col. (2004), limitan estos residuos a tres, en posiciones 217, 221, 247, aunque se han descrito otras variaciones de secuencia que también podrían estar relacionadas. De estos residuos, es el 217 el que estaría directamente relacionado con la virulencia, y algunos autores sugieren, incluso, que puede estar relacionado con la unión eficiente a receptores celulares (Bruslind y Reno, 2000); en este aspecto, la mayoría de los autores concuerdan en que la localización de una treonina, Thr (T), en esta posición, se relaciona con altos niveles de virulencia, y si es una prolina, Pro (P), con niveles de virulencia moderados; sin embargo, ya se han comunicado situaciones en las que cepas con Pro en posición 217 manifiestan altos niveles de virulencia (Julin y col., 2015). El residuo en posición 221 parece estar relacionado con la adaptación al hospedador y el establecimiento de persistencia; se ha visto que este residuo cambia de alanina, Ala (A), a Thr tras el pase por cultivo celular, lo que según Santi y col. (2004) y Julin y col. (2015), implica una adaptación. Además, se considera que las cepas con Thr en esta posición son avirulentas, independientemente del aa situado en 217

(Song y col., 2005). La presencia de Thr o Ala en esta posición ha sido relacionada con el estado de persistencia (Johansen y col., 2009; Julin y col., 2015). Pero los cambios pueden extenderse a los otros residuos y se producen no solo al pasar por cultivo celular, sino también tras una infección en peces (Skjesol y col., 2011; Julin y col., 2015); en los análisis de virulencia con los aislados noruegos, los autores observaron que las cepas con combinaciones T₂₁₇ A₂₂₁ T₂₄₇ y T₂₁₇ T₂₂₁ T₂₄₇ de alta y baja virulencia, respectivamente, cambiaban a P₂₁₇ A₂₂₁ A₂₄₇ al ser recuperadas de los tejidos tras infección experimental. Por otro lado, la localización de una Thr en el residuo 247 también indica altos niveles de virulencia. Aunque las referencias bibliográficas son muy dispares, se podría resumir que, según todos estos autores, las combinaciones T₂₁₇ A₂₂₁ y T₂₁₇ A₂₂₁ T₂₄₇ se relacionan con altos niveles de virulencia y la combinación P₂₁₇ A₂₂₁ con niveles moderados, estando cualquier combinación con T₂₂₁ relacionada, en la mayoría de los casos, con cepas avirulentas y con la persistencia del virus. Estas tres posiciones también se han relacionado con la inmunogenicidad y han sido utilizadas para la elaboración de distintas vacunas capaces de producir altos niveles de anticuerpos neutralizantes y conferir protección a peces vacunados (Munang'andu y col., 2013; Ahmadivand y col., 2018).

A pesar de que se llegó al consenso de que estos tres residuos eran los que estaban directamente relacionados con la virulencia, se han propuesto como posibles determinantes de virulencia otras posiciones en las que se observaron variaciones de secuencia, la mayoría situadas fuera de la región hipervariable descrita por Heppell y col. (1995b) entre los residuos 243 y 261. El primer trabajo que menciona distintos residuos involucrados en la virulencia es el de Bruslind y Reno (2000), quienes ya asocian la virulencia al residuo 217. Observan, además, otras variaciones en los residuos 194, 203, 256 y 386, considerándolas irrelevantes, salvo la del residuo 256, que implicaría un cambio de la estructura secundaria de la proteína. Ruane y col. (2014), propusieron también los residuos 252 y 314 como determinantes de virulencia, hallando una combinación de ambos, N₂₅₂ I₃₁₄, asociada a cepas avirulentas. Shivappa y col. (2004), además de describir distintas variaciones aminoácidas del segmento A que podrían estar relacionadas con la virulencia (residuos 199, 288, 883, 968 y los ya

descritos 217, 221, 247 y 500), propusieron 5 sustituciones aminoacídicas en el segmento B (residuos 125, 154, 187, 240 y 690), de las cuales, tres diferenciarían cepas virulentas de avirulentas (relacionándose la combinación I₁₂₅ T₁₅₄ H₂₄₀ con cepas virulentas y la combinación M₁₂₅ I₁₅₄ R₂₄₀ con avirulentas), siendo además, los primeros autores en proponer la influencia de la secuencia de VP1 en la virulencia de virus tipo IPNV.

Por otro lado, Santi y col. (2004), mencionaron, además de las tres posiciones descritas anteriormente, otras como 112, 427, 486, 500 y 511, en las que se observó cierta variabilidad; sin embargo, finalmente parecían no estar relacionadas con la virulencia.

Pero, el análisis de la secuencia del segmento A no solo reveló diferencias en las regiones de VP2 y NS, sino también en la región codificante de la proteína no estructural VP5, que llevó al conocimiento de distintas formas de VP5 presentes en las cepas de birnavirus acuáticos, que inicialmente también parecían estar relacionadas con la virulencia del virus. Santi y col. (2004) observaron determinadas diferencias en los residuos 112, 427, 496 y 511 que estaban relacionadas con distintas formas de VP5: el codón de iniciación para esta proteína se encontraba en la posición 112, habiendo aislados que no lo poseían, por lo que carecían de ella. La existencia de cepas que no expresan esta proteína ya había sido demostrada con antelación por Heppell y col. (1995a) en la cepa Hetch. Entre los aislados que sí la poseían, había algunos con codones de terminación prematuros en las posiciones 427 y 496, dando lugar a formas truncadas de esta proteína, mientras que otros poseían el codón de terminación normal en la posición 511. En el estudio de Santi y col. (2004) el aislado que no expresaba la VP5 mostró un inicio tardío de la mortalidad y los que expresaban VP5 truncadas parecían presentar mayores niveles de virulencia que los que poseían la proteína completa. Esta observación coincide con otras posteriores en las que los elevados niveles de virulencia se relacionan con cepas con VP5 truncadas (Shivappa y col., 2004; Julin y col., 2015). Una vez más, las observaciones con respecto a la relación de las distintas formas de VP5 y la virulencia de virus IPNV son muy dispares, y aunque diversos autores demostraron que esta proteína es dispensable para la replicación, virulencia y persistencia del virus (Weber y col., 2001;

Santi y col., 2005b), otros siguen relacionando esta proteína con distintos niveles de virulencia, mediante su interacción con los sistemas de inmunidad del huésped, más concretamente con la inhibición de la vía de señalización del interferón (IFN) (Lauksund y col., 2015; Skjesol y col., 2011). Recientemente, Méndez y col. (2015) demostraron que VP5 es esencial para la diseminación del virus entre células, aunque ellos trabajaron con el virus de la bursitis infecciosa de los pollos (IBDV), componente de otro género de la familia *Birnaviridae*.

En el presente estudio, hemos analizado la secuencia genómica de ambos segmentos de una serie de aislados procedentes de epizootias y de portadores asintomáticos, empleando cepas de referencia de virulencia conocida, a modo comparativo, con el objetivo de comprobar si existe una relación clara entre los niveles de virulencia y la presencia de determinantes de virulencia específicos. También se ha analizado si las variaciones en la secuencia aminoacídica pueden tener implicación en la capacidad replicativa de estas cepas.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Líneas celulares y titulación viral

Para la producción y titulación viral se usaron monocapas semiconfluentes de BF-2 (tronco caudal de blueguill, *Lepomis macrochirus*), crecidas a 20 °C en medio esencial de Eagle (EMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina.

La propagación viral se llevó a cabo en frascos de 25 cm², por lo general a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1-0,01 virus/cel; una vez visualizado el efecto citopático (ECP), el virus crudo se recogió y se tituló en placas de 96 pocillos, mediante el método de TCID₅₀/ml. Para ello, se realizaron diluciones seriadas del virus en tampón Earle's suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina. Cada dilución se inoculó por triplicado y las células se incubaron a 15 °C durante 10 días, tras los cuales se leyó el título viral por el método de Reed y Muench (1938).

1.2.2 Cepas virales

Las cepas de IPNV utilizadas en este análisis fueron las cepas de referencia Abild (Ab), West Buxton (WB), Sparajup (Sp) y Norwegian 1 (N1), y los aislados virales obtenidos en nuestro laboratorio, procedentes de piscifactorías gallegas: 2290 (tipo Ab/Ab, aislado de salmón), 1146 (tipo Sp/Sp, aislado de trucha), y de reservorios próximos a las piscifactorías 24R (tipo Ab/Ab, aislado de mejillón) y 88R (tipo Sp/Sp aislado de ostra) (Cutrín y col., 2004; Romero-Brey y col., 2009). Se incluyeron además, aislados de portadores asintomáticos de gallinetas procedentes del banco pesquero Flemish Cap: 19G4 (tipo WB), 20G3 (tipo Ab) y 20G7 (recombinante WB/Ab) (Romero-Brey y col., 2009).

1.2.3 Secuenciación

Las secuencias de las cepas 2290, 1146, 24R, 88R, N1, Ab, Sp y WB ya estaban disponibles al inicio de este trabajo, con excepción de la secuencia del segmento B de la cepa N1 (razón por la que se excluyó del análisis de residuos de VP1 relacionados con la virulencia). Sus secuencias genómicas están incluidas en la GenBank con los códigos de acceso siguientes:

Segmento A: Ab: AF342729; WB: AF078668; Sp: AF342728; N1: D00701; 2290: AJ489224+AJ489232; 1146: AJ489222+AJ489230; 88R: AJ489229; 24R: AJ489227+ AJ489235.

Segmento B: Ab: AY780931; WB: AF078669; Sp: M58757; 2290: CAD32982.1; 1146: CAD32980.1; 88R: CAD32987; 24R: CAD32985.

Las secuencias de las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 se determinaron en el laboratorio, usando 14 parejas de cebadores diseñadas para este fin, sobre la cepa Jasper. Además, también fue necesario completar la secuencia del segmento A la cepa 88R, ya que no poseía la región codificante completa de VP5.

1.2.4 Diseño de cebadores

Para la secuenciación genómica de las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 se diseñaron 14 parejas de cebadores (7 para cada uno de los segmentos genómicos), para amplificar fragmentos de entre 350 y 600 pb, salvo para la región de VP3, que fue de más de 700 pb (Figura 6). Para ello,

se usó el programa Primer Select (Lasergene), tomando como referencia las secuencias genómicas de la cepa de Jasper, con códigos de acceso M18049 para el segmento A y M58756 para el segmento B. Las secuencias, posiciones y tamaños de los fragmentos amplificados por las distintas parejas se representan en las Tabla 1 y 2.

Las primeras dos parejas de cebadores diseñadas para el segmento A se usaron, además, para completar la secuencia de la región VP5 del aislado 88R, ya que la secuencia disponible no abarcaba toda la región codificante.

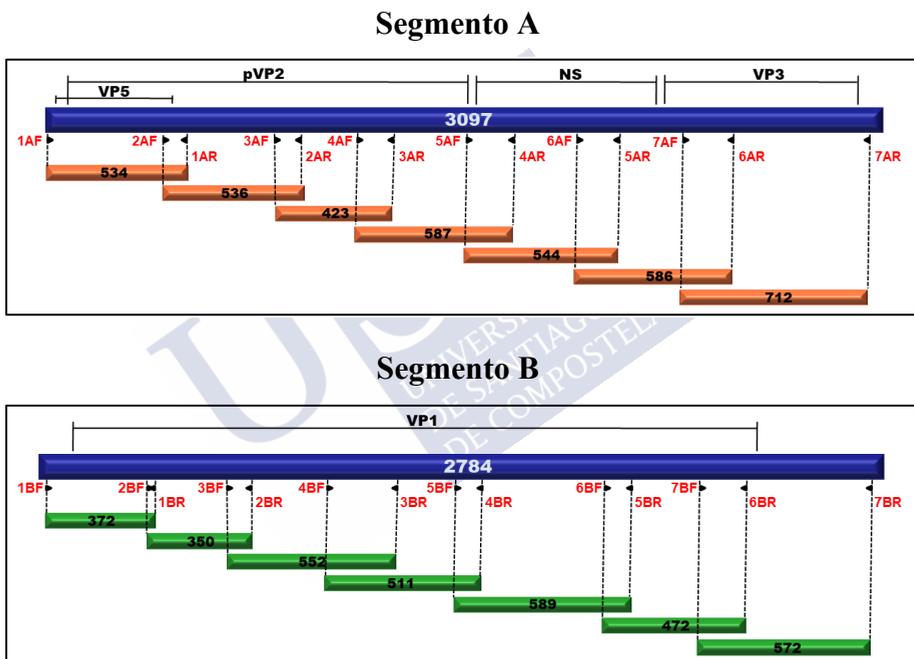


Figura 6. Posición de los cebadores y fragmentos amplificados para la secuenciación de ambos segmentos genómicos. Las posiciones se dan con respecto a las secuencias de la cepa Jasper M18049 y M58756, para los segmentos A y B, respectivamente.

Tabla 1. Secuencia, posición y tamaño de las parejas de cebadores diseñadas para la secuenciación del segmento A de las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 (posiciones con respecto a la secuencia de la cepa Jasper M18049).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición	Tamaño
1AF	GAGAGTTTCAACGTTAGTGGTA	6-539	534
1AR	GCTGTTGTAGGTTAGGCTCTC		
2AF	CCCTTCCCGCTGGTCTGTATGC	445-980	536
2AR	CCCCCTGTAGTTGTCCGCTGTGA		
3AF	GACACGGTTCGACTTCATTCTAC	878-1300	423
3AR	TCAGGGTCATACTTCCATACTTG		
4AF	CTAGTGGCGTACGAGAAGATGACC	1173-1759	587
4AR	TGCACCACAGGAAAGATGACTC		
5AF	GCCGGGGGACGCTACCTGT	1578-2121	544
5AR	GGCTTTGATGTCCACTCCGCAGAT		
6AF	CGGAAACATCGTGGTGGAGAAAA	1967-2552	586
6AR	CTGGTCAGGTCCTTTTGGCTTCTC		
7AF	TGGCCAGAGCAAAAGAAGTGAAGG	2365-3076	712
7AR	GTTACGGCCAGGGGATCAGTCAGG		

Tabla 2. Secuencia, posición y tamaño de las parejas de cebadores diseñadas para la secuenciación del segmento B de las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 (posiciones con respecto a la secuencia de la cepa Jasper M58756).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición	Tamaño
1BF	GTGGCACCCGACATACC	22-393	372
1BR	CCTTCTGGGACGCTTACC		
2BF	CGGTAAGCGTCCCAGAAGG	375-724	350
2BR	GTTGATCGGTAGTGTGCTCCAG		
3BF	GGCAGGAATCCAAACAAGA	638-1189	552
3BR	TCCGTGGAATGGTGAGAAC		
4BF	CATACGTGACCTCGGAAGA	910-1420	511
4BR	CCATGTCCGGTTGTATCG		
5BF	GGCCATGATGTACTACCTCCTGAC	1348-1936	589
5BR	CCGCACTATCTGGTACGCAATCTC		
6BF	CAGCCGCCAAATGGAGATGTTT	1801-2272	472
6BR	AGCGCTTTTGGGGTCCCTTGATGT		
7BF	TAACGCTATCAGAACCCCTAACAA	2106-2677	572
7BR	CAGCTGATTCATTTCCGATTCTTC		

1.2.5 Amplificación de fragmentos genómicos

Para la extracción del RNA viral, se empleó el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el RNA final en 50 µl de H₂O libre de RNasas. La síntesis de cDNA, se llevó a cabo con el kit comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) en un volumen final de reacción de 20 µl: 9 µl de RNA, 1 µl de Random Primers (en un primer paso) y 4 µl de tampón 5X, 1 µl de DTT, 1 µl de dNTPs, 0,2 µl de transcriptasa inversa SSIII y 3,8 µl de agua libre de RNasas (segundo paso). El RNA y los cebadores se incubaron durante 5 min a 95 °C, para favorecer la desnaturalización de RNA y cebadores, pasando inmediatamente a 4 °C. A continuación, se añadió la mezcla elaborada en el paso 2 y se prosiguió con el programa, con otras tres fases: rehibridación a 25 °C durante 5 min, un ciclo de elongación de 50 min a 50 °C y un tratamiento final a 85 °C durante 5 min. La PCR se llevó a cabo con el kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega). Para ello, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 4 µl de cDNA, 10 µl de tampón de PCR 5X Green GoTaq®, 5 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTP, 0,5 µl de cada cebador, 0,25 µl de Go Taq Flexi DNA polimerasa y H₂O libre de RNasas hasta 50 µl. Las mezclas de reacción se sometieron a una desnaturalización inicial de 95 °C, durante 4 min y a 30 ciclos de amplificación, cada uno consistente en una fase de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, rehibridación a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Por último, se aplicó una extensión final a 72 °C, 10 min.

1.2.6 Purificación de fragmentos amplificados

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X, a 120 V durante 1 h, en paralelo con el marcador de peso molecular BrenchTop 100 bp DNA ladder (Promega). Los geles se tiñeron con Red safe (iNtRON Biotechnology), un análogo del bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y las bandas se recortaron para purificar el fragmento amplificado. La purificación se llevó a cabo con el kit comercial Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey Naguel), siguiendo las instrucciones del fabricante y resuspendiendo el DNA

purificado en 40 μ l de tampón TRIS-HCl, pH 8,5. La concentración se midió mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, usando el marcador de peso molecular y concentración 100 bp DNA Mass Ladder Marker (MBiotech).

1.2.7 Reacción de secuenciación

Una vez cuantificada la concentración de cada producto de PCR, éste se sometió a secuenciación mediante el método de incorporación de terminadores dideoxi marcados con colorantes, empleando el kit comercial Genome Lab TM DTCS-Quick Start Kit (Beckman). Para ello, a una cantidad de 10 ng de DNA por cada 100 pb de fragmento a secuenciar, se le añadieron 4 μ l de DTCS, 1 μ l de Sequencing Reaction Buffer, 1 μ l de cada uno de los cebadores (los usados para PCR) y agua libre de RNAsas hasta 20 μ l. Las mezclas de reacción se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 20 s, hibridación a 50 °C durante 20 s y elongación a 60 °C durante 4 min. El producto de amplificación se precipitó en etanol al 95% (a -20 °C), añadiendo 2 μ l de acetato sódico, 2 μ l de EDTA y 1 μ l de glucógeno, por reacción, y centrifugando a 18000 g durante 15 min. Posteriormente, se aplicaron dos lavados con etanol al 75% (a -20 °C), centrifugando a 18000 g 2 min, para eliminar los nucleótidos no incorporados. Una vez retirado el etanol, el DNA se secó en SpeedVac (Savant) y se resuspendió en 40 μ l de tampón SLS (Beckman). Por último, se desnaturalizó a 92 °C durante 2 min y se analizó en un secuenciador CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman).

1.2.8 Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron utilizando los programas SeqMan, EditSeq y MegAlin (Lasergene). El análisis de VP5 y de los residuos relacionados con la virulencia se hizo mediante alineamiento y comparación de todas las secuencias usando el programa MegAlin (Lasergene). En el segmento A se analizaron los distintos tipos de VP5 presentes en cada cepa y los dominios aminoacídicos presentes en las regiones de VP2 y NS relacionadas con la virulencia propuestos por Santi y col., (2004): 217, 221, 247, 496 y 500. En el

segmento B, se analizaron los residuos que Shivappa y col. (2004), relacionaron con la virulencia: 125, 154, 187, 240 y 690.

La cepa N1 no se incluyó en el análisis de los residuos de VP1 relacionados con la virulencia, por no disponer de la secuencia del segmento B.

1.2.9 Replicación diferencial de cepas de birnavirus acuáticos

Para evaluar si las diferencias de secuencia entre las distintas cepas incluidas en el análisis afectaban a su fenotipo, se llevó a cabo un análisis de la capacidad replicativa. Para ello, placas de 48 pocillos con monocapas semiconfluentes de BF-2, se inocularon con las distintas cepas a una MOI de 0,1 virus/célula (6 réplicas por cepa). Para comparar la capacidad de adhesión a la célula y de replicación de cada cepa, se titularon de nuevo (por triplicado), como se ha descrito en el apartado 1.2.1, a tiempos pre-y post- adsorción, al inicio del efecto citopático y tras la destrucción del tapiz celular.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Secuenciación genómica *de novo*

Las secuencias genómicas de las cepas 2290, 1146, 24R, 88R, N1, Ab, Sp y WB ya estaban disponibles en la GenBank al inicio de este trabajo, con excepción de la secuencia del segmento B de la cepa N1 (códigos de acceso en el apartado 1.2.3).

Las secuencias de las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 se determinaron en el laboratorio con las 14 parejas de cebadores diseñadas para este fin. Para completar la secuencia de la cepa 88R, se usaron también las dos primeras parejas diseñadas para el segmento A, ya que no poseía la región codificante de VP5 completa. Se obtuvieron así, para el segmento A, secuencias de 3027 nucleótidos en la cepa 19G4, 2946 en la cepa 20G3 y 2995 en 20G7; todas ellas abarcaban la región codificante de VP5 completa, así como las regiones de VP2-NS con los residuos vinculados a la virulencia a analizar en este capítulo. El fragmento secuenciado para completar la región de VP5 de la cepa 88R obtenido con las parejas de cebadores 1 y 2, fue de 760 nucleótidos.

Para el segmento B, se obtuvieron secuencias de 2631 nucleótidos en la cepa 19G4, 2572 en 20G3 y 2589 en la cepa 20G7, todas ellas con la región codificante de VP1 completa.

La secuenciación de ambos segmentos permitió un completo tipado de las 3 cepas del Flemish Cap (Terranova), resultando una -19G4- del tipo salvaje WB (con ambos segmentos del mismo tipo WB/WB), otra -20G3- de tipo Ab (Ab/Ab) y la tercera -20G7- un recombinante con el segmento A de tipo WB y el B de tipo Ab (WB/Ab) (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos virales de las cepas del Flemish Cap, deducidos por secuenciación de ambos segmentos genómicos.

Cepa	Seg A	Seg B	Tipo
19G4	WB	WB	WB
20G7	WB	Ab	R (WB/Ab)
20G3	Ab	Ab	Ab

La homología entre las secuencias del segmento A obtenidas para las cepas 19G4 y 20G7 fue muy elevada (99,8%), al igual que entre estas cepas y la cepa de referencia WB (99,8% y 99,9% respectivamente), mientras que la secuencia del segmento A de 20G3 (tipo Ab) mostró una homología de un 99,6% con su cepa de referencia Ab. La homología con los otros aislados tipo Ab (2290 y 24R) fue de un 99,5% (Tabla 4A).

En el caso del segmento B, la secuencia obtenida para 19G4 mostró un 100% de homología con WB, y las secuencias de 20G3 y 20G7 mostraron una homología con Ab del 98,6% (Tabla 4B). En este caso es de destacar, que las homologías de las secuencias de estos dos aislados son mayores con las de los otros aislados tipo Ab de distinto origen, que con la propia cepa de referencia (99,9% con 2290 y 24R).

Tabla 4. Porcentaje de homología entre las secuencias genómicas de las distintas cepas.

A. Segmento A				B. Segmento B			
Cepa	19G4	20G3	20G7	Cepa	19G4	20G3	20G7
19G4	-	-	99,8	19G4	-	-	-
20G3	-	-	-	20G3	-	-	100
20G7	99,8	-	-	20G7	-	100	-
2290	-	99,5	-	2290	-	99,9	99,9
1146	-	-	-	1146	-	-	-
88R	-	-	-	88R	-	-	-
24R	-	99,5	-	24R	-	99,9	99,9
N1	-	-	-	N1	-	-	-
Ab	-	99,9	-	Ab	-	98,6	98,6
Sp	-	-	-	Sp	-	-	-
WB	99,8	-	99,9	WB	100	-	-

1.3.2 VP5 en las distintas cepas

Como paso inicial, se llevó a cabo un estudio previo de las secuencias genómicas conocidas de las cepas de referencia WB, Sp, N1 y Ab, con el fin de determinar los tipos de ORF correspondientes a la región codificante de VP5. Como se muestra en la Figura 8, entre estas cepas se encontraron 3 tipos de ORF. El primero, es un ORF truncado de 45 nucleótidos, con el codón de iniciación en la posición 79-81, pero que se encuentra en la misma pauta de lectura con un codón de terminación en posición 124-126; este tipo se encuentra en la cepa WB. En ella, también encontramos un segundo tipo, un ORF de 399 nucleótidos (correspondiente a una proteína de 133 aa), que se encuentra en una pauta de lectura distinta, comenzando en el nucleótido 123 y finalizando con un codón de terminación en posición 522-524; este ORF también estuvo presente en las cepas de referencia Ab y Sp. En Sp y Ab se encontró además un tercer tipo de ORF, más largo, de 444 nucleótidos (148 aa), comenzando en el nucleótido 79 y finalizando en el 522 (codón de terminación en posición 523-525), siendo también este tercer ORF el único presente en la cepa N1.

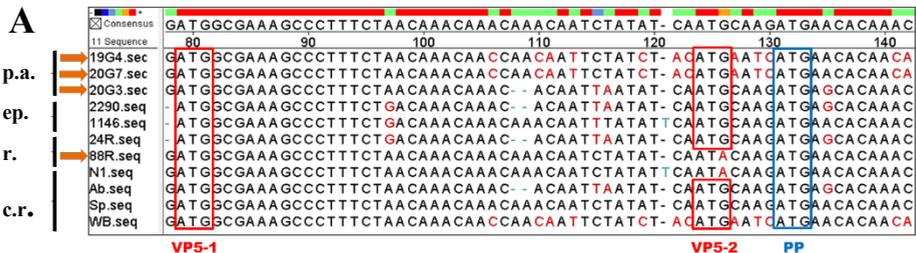
En base a las secuencias obtenidas, pudieron determinarse los codones de iniciación y terminación que dan lugar a las distintas formas de VP5 presentes en cada una de las 4 cepas secuenciadas (19G4, 20G7,

20G3 y 88R). Así mismo, se analizaron las secuencias de los otros aislados obtenidos en el laboratorio (Figura 7).



Figura 7. Esquema de los distintos tipos de VP5 presentes en las cepas incluidas en el análisis.

Como se muestra en la Figura 8, entre los aislados analizados se encontraron los tres tipos de ORF para VP5. En 19G4 y 20G7 se observaron las dos formas características de la cepa de referencia WB: la forma truncada de 45 nucleótidos, correspondiente a una VP5 de tan solo 15 aa, y el segundo tipo de ORF, codificante de una proteína de 133 aa. En los aislados 20G3, 2290, 1146 y 24R se observó el patrón característico de las cepas Ab y Sp, formado por el segundo ORF codificante de una proteína de 133 aa, y el tercer tipo de ORF, codificante de una proteína de 148 aa, siendo este último ORF el único que se hayó en las cepas N1 y 88R.



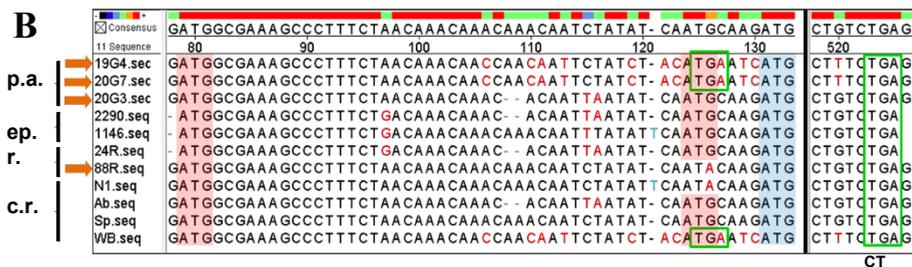


Figura 8. Tipos de ORF para VP5 presentes entre los aislados virales. **A.** Regiones con los codones de inicio para las dos formas de VP5 y la PP. **B.** Regiones con los codones de terminación para la proteína VP5. Las flechas indican las secuencias obtenidas en el laboratorio. Los aislados se obtuvieron de portadores asintomáticos (p.a.), epizootias (ep.) y reservorios (r.) y se compararon con 4 cepas de referencia (c.r.). CT: codón de terminación (TGA).

1.3.3 Análisis de la secuencia de aa en las regiones de VP2 relacionadas con la virulencia

En este apartado se analizaron las secuencias aminoacídicas correspondientes a VP2 en los aislados objeto de estudio, para determinar los aa presentes en los residuos 217, 221, 247, 496, y 500 de la región de VP2, y elucidar si se corresponden o no con el tipo de residuos relacionados con la virulencia descritos por Santi y col. (2004).

Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 9 y la Tabla 5. Ninguna de las cepas incluidas en el análisis posee Thr en posición 217, considerado el mayor determinante de virulencia; los aa observados en esta posición fueron Pro (en las cepas 20G3, 2290, 1146, 88R, 24R, N1 y Sp), Ala (en 19G4, 20G7 y Ab) o glicina (Gly, G) (en WB). La posición 221 está ocupada por el aa Thr en todas las cepas, residuo relacionado con cepas avirulentas y con el establecimiento de la persistencia. Las posiciones 247 y 496 están ocupadas por Ala (A), menos en el caso de la cepa 20G3, donde la A₄₉₆ se sustituye por arginina (Arg, R). La posición 500 es un poco más variable: en el residuo 500, el aa más frecuente es tirosina (Tyr, Y), seguido de histidina (His, H) (en 2290, 88R y N1), apareciendo también Leu (L) en la cepa 20G3.

Además de las diferencias observadas en los residuos relacionados con la virulencia, hemos observado unos residuos próximos a éstos, altamente variables, que hemos tenido en consideración y cuyos aa se reflejan también en la Figura 9 y la Tabla 5. Estos residuos se

encuentran en las posiciones 243, 249, 250 y 473. Los resultados parecen indicar que estas posiciones pueden estar relacionadas con la determinación del genotipo-serotipo, ya que todas las cepas tipo WB poseen la combinación T₂₄₃ E₂₄₉ V₂₅₀ A₄₇₃ y todas las cepas tipo Ab contienen la combinación S₂₄₃ N₂₄₉ T₂₅₀ V₄₇₃, con la excepción del aislado 20G3 en donde la posición 473 cambia a serina (Ser, S). Por último, todas las cepas del serotipo Sp poseen la combinación N₂₄₃ Q₂₄₉ A₂₅₀ M₄₇₃, salvo la cepa Sp donde la posición 473 está ocupada por el aa Thr.

Consensus	200	210	220	230	240	250	260
19G4.PP.pro	ATAPRRYEI	DLPSERLPTVAATCT	PTTI	YEGNADI	VNSTTVTGDI	TFQLAAEFV	NETRDFI LQF
20G7.PP.pro	AIAPRRYEI	DLPSERLPTVAATCT	PTTI	YEGNADI	VNSTTVTGDI	TFQLAAEFV	NETRDFI LQF
20G3.PP.pro	ATAPRRYEI	DLPSQRLPTVPATCT	TTI	YEGNADI	VNSTTVTGDI	SFSLANNFT	ADI KDFDQLDF
2290.PP.pro	ATAPRRYEI	DLPSQRLPTVPATCT	TTI	YEGNADI	VNSTTVTGDI	SFSLANNFT	ADI KDFDQLDF
1146.PP.pro	AIAPRRYEI	DLPSQRLPPVPAICT	TTL	YEGNADI	VNSTTVTGDI	NFSLAQQFA	NETKFFHFQLDF
88R.PP.pro	ATAPRRYEI	DLPSQRLPPVPAICT	TTL	YEGNADI	VNSTTVTGDI	NFSLAQQFA	NETKFFHFQLDF
24R.PP.pro	ATAPRRYEI	DLPSQRLPTVPATCT	TTI	YEGNADI	VNSTTVTGDI	SFSLANNFT	ADI KDFDQLDF
N1.PP.pro	AIAPRRYEI	DLPSQRLPPVPAICT	TTL	YEGNADI	VNSTTVTGDI	NFSLAQQFA	NETKFFHFQLDF
Ab.PP.pro	AIAPRRYEX	DLPSERLPTVAATCT	PTTI	YXGXGDI	VNSTTVTGDI	SFSLANNFT	ADI KDFDQLDF
Sp.PP.pro	AIAPRRYEI	DLPSQSLPPVPAICT	TTL	YEGNADI	VNSTTVTGDI	NFSLAERFA	NETRDFDQLDF
WB.PP.pro	AIAPRRYEI	DLPSERLPTVAATCT	PTTI	YEGNADI	VNSTTVTGDI	TFQLAAEFV	NETRDFI LQF

Consensus	470	480	490	500	510	520
19G4segA.pro	APLI	GAADQFI	GDLTKTNSAGGRYLSHAA	GGRY	RDVMDT	WASGSSETGSYSKHLKTRL
20G7segA.pro	APLI	GAADQFI	GDLTKTNSAGGRYLSHAA	GGRY	RDVMDT	WASGSSETGSYSKHLKTRL
20G3segA.pro	ST	THVSRP	THRRSH	HORSRRKVPLHGR	RRRLDGCNGLL	GQRRTRREVLPGSKEOT
2290 segA.pro	APLI	GVADQLI	GDLTNTNAAAGGRYRSM	AA	GGRFH	KDVMDSWASGGPDGKFSQALKNRL
1146 segA.pro	APLI	GMADQFI	GDLTKTNSAGGRYRSM	AA	GGRFH	KDVL ESWASGGPEGKFSRALKNRL
88R segA.pro	APLI	GMADQFI	GDLTKTNSAGGRYRSM	AA	GGRFH	KDVL ESWASGGPDGKFSRALKNRL
24R segA.pro	APLI	GVADQLI	GDLTNTNAAAGGRYRSM	AA	GGRFH	KDVMDSWASGGPNGKFSQALKNRL
N1segA.pro	APLI	GMADQFI	GDLTKTNSAGGRYRSM	AA	GGRFH	KDVL ESWASGGPDGKFSRALKNRL
ABsegA.pro	APLI	GVADQLI	GDLTNTNAAAGGRYRSM	AA	GGRFH	KDVMDSWASGGPDGKFSQALKNRL
SPsegA.pro	APLI	GTADQFI	GDLTKTNSAGGRYRSM	AA	GGRFH	KDVL ESWASGGPDGKFSRALKNRL
WBsegA.pro	APLI	GAADQFI	GDLTKTNSAGGRYLSHAA	GGRY	RDVMDT	WASGSSETGSYSKHLKTRL

Figura 9. Residuos aminoacídicos presentes en la región VP2-NS con posible relación con la virulencia. En rojo se marcan las posiciones 217, 221, 247, 496 y 500, que en la literatura se han relacionado con la virulencia y que fueron analizadas en este capítulo. En verde se enmarcan residuos altamente variables observados en este análisis y que han sido tenidos en consideración.

Tabla 5. Aminoácidos observados en los residuos de VP2 relacionados con la virulencia. En la zona sombreada se muestran los aminoácidos adicionales, observados en este análisis en regiones muy variables.

Cepa	Tipo	217	221	247	496	500	243	249	250	473
19G4	WB/WB	Ala	Thr	Ala	Ala	Tyr	Thr	Glu	Val	Ala
20G7	WB/Ab	Ala	Thr	Ala	Ala	Tyr	Thr	Glu	Val	Ala
20G3	Ab/Ab	Pro	Thr	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Thr	Ser
2290	Ab/Ab	Pro	Thr	Ala	Ala	His	Ser	Asn	Thr	Val
1146	Sp/Sp	Pro	Thr	Ala	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ala	Met
88R	Sp/Sp	Pro	Thr	Ala	Ala	His	Asn	Gln	Ala	Met
24R	Ab/Ab	Pro	Thr	Ala	Ala	Tyr	Ser	Asn	Thr	Val
N1	Sp/Sp	Pro	Thr	Ala	Ala	His	Asn	Gln	Ala	Met
Ab	Ab/Ab	Ala	Thr	Ala	Ala	Tyr	Ser	Asn	Thr	Val
Sp	Sp/Sp	Pro	Thr	Ala	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ala	Thr
WB	WB/WB	Gly	Thr	Ala	Ala	Tyr	Thr	Glu	Val	Ala

1.3.4 Análisis de los residuos de VP1 relacionados con la virulencia

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP1 reveló muy poca variabilidad entre estas cepas (Tabla 6 y Figura 10). Tan solo se observaron diferencias en la posición 690, encontrándose en esta el aa fenilalanina (Phe, F) en la mayoría de las cepas y el aa glutamina (Glu, E) en la cepa Ab, y Ala en WB y 19G4. En las otras posiciones se repite la combinación I₁₂₅ I₁₅₄ P₁₈₇ H₂₄₀ (isoleucina/isoleucina/ prolina/ histidina).

Además de estos residuos, en las posiciones correspondientes a los descritos por Shivappa y col. (2004), vinculados con la virulencia del virus, hemos observado en la secuencia aminoacídica de estas cepas otras tres regiones que difieren bastante entre las cepas analizadas. Estos residuos, en posiciones 85, 176 y 658, parecen estar relacionados con la determinación del serotipo/genotipo ya que las cepas tipo Ab presentan la combinación E₈₅ A₁₇₆ N₆₅₈, mientras que las tipo Sp y WB presentan la combinación D₈₅ G₁₇₆ T₆₅₈ (Figura 11 y Tabla 6).

Consensus	GTFGAPDI TLLKQLTF			RQVREAIATLQYGS			ATGRNPNTPLAVGYT			DKSYLPHVTVKSSA			NTPEAEFDI KDRP		
10 Sequences	120	130	150	160	180	190	240	690							
19G4.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
20G7.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
20G3.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
2290.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
1146.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
88R.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
24R.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
AB.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
SP.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				
WB.pro	GTFGAPDI	TLLKQLTF	RQVREAI	ATLQYGS	ATGRNPNT	PLAVGYT	DKSYLPH	VTVKSSA	NTPEAEF	DI	KDRP				

Figura 10. Aminoácidos presentes en las regiones de VP1 relacionadas con la virulencia. En rojo se marcan las posiciones que en la literatura se han relacionado con la virulencia (Shivappa y col., 2004) y que fueron analizadas en este capítulo.

Consensus	AMVXDGKLL			NRLLAMKXVATGRNP			VTGFLDDWNXMFEGGDL		
10 Sequences	90	170	180	650	660				
19G4.pro	QMV	DGKLL	NRLLAMK	GVA	TGRNP	TSPGS	MPGT	TCONS	NAET
20G7.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	A	VATGRNP	VTGFL	DDWN	NMSEF	GGDL
20G3.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	A	VATGRNP	VTGFL	DDWN	NMSEF	GGDL
2290.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	A	VATGRNP	VTGFL	DDWN	NMSEF	GGDL
1146.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	GVA	TGRNP	VTGFL	DDWN	TMSEF	GGDL
88R.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	GVA	TGRNP	VTGFL	DDWN	TMSEF	GGDL
24R.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	A	VATGRNP	VTGFL	DDWN	NMSEF	GGDL
AB.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	A	VATGRNP	DVTGFL	DDWN	NMSEF	GGD
SP.pro	AMV	DGKLL	NRLLAMK	GVA	TGRNP	VTGFL	DDWN	TMSEF	GGDL
WB.pro	QMV	DGKLL	NRLLAMK	GVA	TGRNP	TSPGS	MPGT	TCONS	NAET

Figura 11. Residuos variables observados en la región codificante de VP1. En verde se enmarcan 3 residuos que no se mencionan en la literatura, pero en los que se ha observado una gran variabilidad en este análisis y, por ello, se han tenido en consideración.

Tabla 6. Aminoácidos observados en los residuos de VP1. En la zona sombreada se reflejan tres residuos, que no se mencionan en la literatura, pero que se han tomado en consideración.

Cepa	125	154	187	240	690	85	176	658
19G4	Ile	Ile	Pro	His	Ala	Asp	Gly	Thr
20G7	Ile	Ile	Pro	His	Phe	Glu	Ala	Asn
20G3	Ile	Ile	Pro	His	Phe	Glu	Ala	Asn
2290	Ile	Ile	Pro	His	Phe	Glu	Ala	Asn
1146	Ile	Ile	Pro	His	Phe	Asp	Gly	Thr
88R	Ile	Ile	Pro	His	Phe	Asp	Gly	Thr
24R	Ile	Ile	Pro	His	Phe	Glu	Ala	Asn
Ab	Ile	Ile	Pro	His	Glu	Glu	Ala	Asn
Sp	Ile	Ile	Pro	His	Phe	Asp	Gly	Thr
WB	Ile	Ile	Pro	His	Ala	Asp	Gly	Thr

1.3.5 Replicación diferencial

Los resultados del análisis de la capacidad replicativa llevados a cabo con las distintas cepas se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de replicación diferencial de las cepas de referencia de IPNV y los distintos aislados naturales. (I): inicio del ECP, (D): destrucción total del tapiz celular.

Cepa	N° VP5	% Adsorción	Tiempo ECP (I)	Título ECP (I)	Tiempo ECP (D)	Título ECP (D)
19G4	2	94,4	≤ 2	$2,14 \times 10^9$	3	$3,97 \times 10^9$
20G7	2	100	≥ 3	$1,22 \times 10^7$	6	$1,43 \times 10^9$
20G3	2	100	3	$7,87 \times 10^5$	8	$2,23 \times 10^8$
2290	2	90,3	≤ 2	$3,51 \times 10^9$	4	$1,77 \times 10^9$
1146	2	98,4	≤ 2	$1,29 \times 10^9$	4	$2,56 \times 10^9$
88R	1	98,4	2	$2,7 \times 10^7$	4	$1,18 \times 10^9$
24R	2	97,2	≤ 2	$5,6 \times 10^8$	4	$5,6 \times 10^8$
N1	1	97,2	≤ 2	$2,16 \times 10^7$	4	$1,26 \times 10^8$
Ab	2	50	≤ 2	$4,38 \times 10^7$	3	$3,97 \times 10^7$
Sp	2	91,1	2	$1,75 \times 10^8$	4	$3,51 \times 10^8$
WB	2	54,7	2	$9,82 \times 10^8$	4	$2,64 \times 10^9$

Los niveles de adsorción fueron en general altos para todas las cepas, alcanzando valores superiores al 90%, e incluso del 100% en las cepas 20G3 y 20G7. Solo las cepas de referencia Ab y WB mostraron niveles de adsorción inferiores, con porcentajes de 50% y 54,7% respectivamente. El inicio del ECP se produjo a los dos días en la mayoría de las cepas, tiempo en el cual en algunas cepas (indicadas como ≤ 2) el efecto ya estaba bastante avanzado; en las cepas 20G3 y 20G7, el ECP se produjo de una manera más lenta, no detectándose hasta el tercer día, siendo en el caso de la cepa 20G7 un efecto aún tenue a día 3 (≥ 3). El menor título al inicio del ECP observado se produjo en la cepa 20G3 ($7,87 \times 10^5$), que precisamente mostró un inicio más tardío, al igual que la cepa 20G7 que también alcanzó, al inicio, un título bastante bajo. Esta cepa y las cepas 88R, N1 y Ab, alcanzaron títulos de en torno a 10^7 al inicio del ECP. Las cepas 24R, Sp y WB alcanzaron valores intermedios, con títulos de 10^8 , siendo las cepas 2290 y 1146 las que alcanzaron un título más elevado al inicio del ECP ($3,51 \times 10^9$, $1,29 \times 10^9$, respectivamente). La destrucción total del tapiz se produjo de 1 a 2 días tras el inicio del ECP en la mayoría de los casos, mientras que en las cepas 20G3 y 20G7 se produjo, una vez más, de una manera más

lenta; en 20G7 la destrucción total se observó a día 6 (3 días después del inicio) y en 20G3 a día 8 (5 días después). Pese a la diferencia en los niveles de adsorción y en los tiempos de replicación, todas las cepas (con excepción de Ab) alcanzan altos títulos en la lisis total del tapiz (valores de 10^8 y 10^9) siendo las cepas 88R, 20G3 y 20G7 las que mostraron un mayor incremento en el título desde el inicio al final del ECP.

1.4 DISCUSIÓN

Hay discrepancias entre los autores respecto a la implicación de VP5 en los niveles de virulencia de virus tipo IPNV, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, aunque tanto Weber y col. (2001) como Santi y col. (2005b) afirman que VP5 es dispensable para la replicación, virulencia y persistencia del virus, Méndez y col. (2015) demostraron que es fundamental para la dispersión del virus IBDV. En nuestro estudio se han observado tres tipos de VP5: la VP5 típica, de 148 aa, y dos formas truncadas de 133 y 15 aa. La mayoría de las cepas incluidas en el análisis pueden expresar dos de ellas: las cepas WB, 19G4 y 20G7 (serotipo WB) presentan las formas de 148 y 15 aa; las cepas Sp, 1146 (serotipo Sp), Ab, 20G3, 2290 y 24R (serotipo Ab) presentan las VP5 de 148 y 133 aa, y solo las cepas N1 y 88R (serotipo Sp) presentan una única forma de VP5 de 148 aa. A pesar de las distintas formas detectadas, no se observó ninguna relación directa entre la expresión de una forma determinada y la capacidad de adsorción o de replicación del virus, ya que en los resultados de replicación diferencial se observaron niveles de adsorción altos y bajos para cada patrón de VP5, y los niveles de replicación fueron similares en todas las cepas. Por otro lado, tampoco encontramos relación entre los tipos de ORF contenidos por las cepas y su nivel de virulencia putativa en base al origen del aislado.

En relación con los residuos de la región VP2-NS, a pesar de que se ha determinado que los residuos del segmento A relacionados con la virulencia son los de las posiciones 217, 221, 247 (Bruslind y Reno, 2000; Santi y col., 2004; Shivappa y col., 2004) y que se ha propuesto que las combinaciones T₂₁₇ A₂₂₁ y T₂₁₇ A₂₂₁ T₂₄₇ se relacionan con altos niveles de virulencia, P₂₁₇ A₂₂₁ con niveles de virulencia moderados y

las que incluyen T₂₂₁ con las cepas avirulentas, existen discrepancias en cuanto a estos patrones de virulencia, ya que diversos autores han observado que no siempre se cumplen. Ruane y col. (2014) trabajando con aislados irlandeses, comprobaron que las cepas con la combinación P₂₁₇ A₂₂₁ presentaban niveles de virulencia superiores a los esperados. Salgado-Miranda y col. (2014) observaron algo similar en aislados mexicanos, donde cepas con la combinación A₂₁₇ T₂₂₁ E₂₄₇ que se suponía deberían ser avirulentas por poseer Thr en posición 221, presentaban niveles de mortalidad moderada. Nuestros resultados parecen diferir también de las pautas de virulencia propuestas para estos tres residuos, ya que a pesar de que, a priori, todas las cepas deberían ser avirulentas por poseer Thr en la posición 221, y de presentar aminoácidos en la posición 217 que implican baja virulencia (no Thr) todas ellas, con excepción de Ab, muestran altos niveles de adsorción y replicación en la línea celular BF-2. Además, entre todas ellas, si bien unas provienen de peces portadores asintomáticos, lo que justificaría el tipo de determinante, otras provienen de epizootias, por lo que deberían mostrar los determinantes de alta virulencia.

Teniendo en cuenta que el aa en posición 217 parece estar relacionado con la unión a receptores celulares (Bruslind y Reno, 2000), nuestros resultados de replicación diferencial *in vitro*, parecen indicar que la ubicación de una Pro en esta posición implica una mayor eficiencia en la adsorción a la célula (porcentajes de adsorción por encima del 90%) que los aa Gly y Ala, ya que cepas con estos aa en esa posición (WB y Ab) muestran menores porcentajes de adsorción; no obstante, en el caso de la Ala₂₁₇, hay otras dos cepas (19G4 y 20G7) que la presentan y muestran una elevada adsorción. No se ha encontrado ninguna relación entre la variación de secuencia en estas posiciones y su capacidad replicativa, ya que a pesar de que las cepas 20G7, 88R, N1 y Ab alcanzan bajos títulos al inicio del ECP, sus valores de TCID₅₀/ml en el momento de lisis total del tapiz son similares a los de las otras cepas (con excepción de Ab). Por lo tanto, no se observan diferencias claras en la capacidad de replicación de las cepas analizadas, a pesar de diferir en el aa 217, directamente relacionado con la virulencia. Esa ralentización para alcanzar la máxima producción viral podría deberse a una peor eficacia en la dispersión entre células,

característica que según Méndez y col. (2015), se debe a no codificar una VP5 completa, al menos en IBDV. Sin embargo, algunos de estos virus tienen un ORF no truncado al inicio, por lo que no puede ser la explicación.

Las otras tres posiciones descritas por Santi y col. (2004) se muestran más variables en estas cepas, salvo el residuo 496, que en la mayoría de las cepas presentan una Ala. En la posición 500 se observaron los aa Tyr e His. La única cepa que difiere en estos residuos es el aislado 20G3, que posee Arg en la posición 496 y Leu en 500, lo que podría relacionarse con su replicación más lenta, ya que esta cepa tarda 3 días en iniciar el ECP, siendo el título al inicio muy bajo 7.87×10^5 TCID₅₀/ml (al menos dos log inferior al de las otras cepas) y necesitando además 8 días para completar el ECP.

Un dato a destacar de este análisis es que el estudio de estos residuos nos ha llevado a la detección de una serie de cambios en los aislados procedentes del Flemish Cap (19G4, 20G3 y 20G7) con respecto a las cepas de referencia de su mismo tipo, que podrían explicar las diferencias de comportamiento observadas en el capítulo anterior. Estas diferencias son: un cambio de Gly (G) a Ala (A) en posición 217 de la cepa WB a las 19G4 y 20G7, y un cambio de A₄₉₆ Y₅₀₀ de la cepa Ab, a R₄₉₆ L₅₀₀ R en la cepa 20G3.

Otras posiciones, no reflejadas en la literatura, pero en las que hemos observado una secuencia altamente variable, se corresponden con los residuos 243, 249, 250 y 473. Los cambios observados en ellas parecen estar relacionadas con la determinación del serotipo de la cepa, ya que las cepas tipo WB poseen la combinación T₂₄₃ E₂₄₉ V₂₅₀ A₄₇₃, y todas las cepas tipo Ab contienen la combinación S₂₄₃ N₂₄₉ T₂₅₀ V₄₇₃, con la excepción del aislado 20G3, en donde la posición 473 cambia a serina. Por último, todas las cepas del serotipo Sp poseen la combinación N₂₄₃ Q₂₄₉ A₂₅₀ M₄₇₃; salvo la cepa Sp, donde la posición 473 está ocupada por el aa treonina. Estas combinaciones tampoco parecen estar relacionadas con la virulencia de las cepas ensayadas, ya que no justifican las diferencias de adsorción y replicación observadas.

En IBDV se ha descrito que las variaciones en la región codificante de VP2 no son el único factor de regulación de la virulencia del virus, siendo demostrada también la influencia de la polimerasa viral en la

eficiencia de replicación y la virulencia (Liu y Vakharia, 2004; Boot y col., 2005; Wei y col., 2006), identificándose distintos residuos en esta proteína que difieren entre cepas virulentas y avirulentas (4, 61, 145, 287, 508, 511, 646 y 687) (Wei y col., 2006) e incluso residuos específicos (115, 653) que determinan la replicación en una línea celular concreta (Brandt y col., 2001). Sin embargo, hasta donde sabemos, en IPNV, solo Shivappa y col. (2004) relacionaron ciertos residuos de VP1 con la virulencia (125, 154, 187, 240 y 690), estando este hecho aún sin demostrar. Nosotros hemos analizado en este capítulo los aa presentes en estas posiciones en nuestras cepas, no encontrando una relación directa entre las diferencias en la secuencia de aa y las diferencias de adsorción-replicación observadas. Tan solo se observaron diferencias en los aa del residuo 690, en el cual la mayoría de las cepas presentan Phe, mientras que las cepas 19G4 y WB presentan Ala y la cepa Ab Glu. Teniendo en cuenta los datos de adsorción y replicación, podríamos deducir que la localización de un Glu en esta posición conlleva a una disminución de la capacidad de adsorción de las partículas, ya que esta cepa es la que presenta el menor porcentaje de adsorción (50%), e incluso, una cierta desventaja replicativa, ya que sus títulos al inicio del ECP y en el momento de lisis total son inferiores a los de las otras cepas ensayadas. La localización de una alanina podría representar también una inferior capacidad de replicación, ya que la cepa WB es la segunda cepa con menor capacidad de adsorción (54,7%), aunque este hecho no queda claro, ya que 19G4 también presenta una Ala en posición 690, siendo su adsorción del 94,4%, y además, no se observan diferencias de replicación entre estas dos cepas y las demás (con Phe en 690).

Los residuos altamente variables en estas cepas, en posiciones 85, 176 y 658 de la región codificante de VP1, no parecen tampoco estar relacionados con la virulencia. En este caso, al igual que los residuos variables observados en el segmento A, parecen estar relacionados con la determinación del serotipo-genotipo de la cepa, ya que todas las cepas tipo Sp y WB (WB, 19G4, Sp, 1146, 88R) presentan la combinación Asp, Gly, Thr en estas posiciones, mientras que las cepas tipo Ab (Ab, 20G3, 20G7, 2290 y 24R) presentan la combinación Glu, Ala, Asn.

Los resultados de esta primera fase de estudio no parecen apoyar la tesis de algunos autores de que la virulencia de IPNV está determinada por residuos aminoacídicos específicos en las proteínas virales, fundamentalmente en VP2 y VP1. Estos resultados nos han impulsado a plantearnos la hipótesis de que debe haber, en este virus, más factores en juego y que el nivel de virulencia de la cepa viene determinado por varios factores al mismo tiempo.





CAPÍTULO 2: *REASSORTMENT*

2.1 INTRODUCCIÓN

El *reassortment* es un tipo de recombinación genética que implica el intercambio de segmentos genómicos entre cepas de un mismo virus. Este fenómeno fue descrito por primera vez en acuabirnavirus por Romero-Brey y col. (2009), quien, haciendo un análisis genético de acuabirnavirus aislados de poblaciones naturales de peces en el banco pesquero Flemish Cap, comprobó que parte de los acuabirnavirus analizados poseían un genoma compuesto por segmentos procedentes de dos tipos distintos. Desde entonces, se han detectado multitud de cepas recombinantes en diferentes localizaciones de todo el planeta (Cutrín y col., 2010; Lago y col., 2014; Moreno y col., 2014). En el año 2015 se confirmó la presencia de *reassortment* también en avibirnavirus, otro género de la familia *Birnaviridae* (Lu y col., 2015).

Este fenómeno también fue descrito en otras familias virales y con frecuencias muy diferentes. Así, hantavirus, lassa virus, tenuivirus poseen bajas tasas de *reassortment*, mientras que Influenza A, rotavirus A y cystovirus poseen altas tasas (Simon-Loriere y Holmes, 2011) y constituye, junto con las mutaciones secuenciales y la recombinación genética, uno de los mecanismos de evolución de virus de RNA bicatenal (Wei y col., 2006) y uno de los principales mecanismos para modificar la estructura de los genes y genomas, contribuyendo a la diversidad genética de este tipo de virus (Devold y col., 2006). Desafortunadamente, los mecanismos del *reassortment* continúan siendo desconocidos.

Se han descrito dos tipos de *reassortment*, uno en el que la incorporación de los segmentos durante la replicación ocurre al azar y otro donde la incorporación está mediada por una serie de señales que permiten la selección de segmentos específicos (Pérez-Losada y col., 2015). Hasta la fecha, se han observado muchos indicios para el

segundo de ellos. Las señales de incorporación para acuabirnavirus no se conocen, pero sí se han sido descrito en otras familias virales: en reovirus el *reassortment* depende de tres nucleótidos en su región terminal UTR 5' y de determinadas mutaciones en dicha región (Roner y col., 2004), mientras que en nodavirus se han propuesto una serie de sustituciones en ambos segmentos genómicos que pueden estar involucradas en el proceso de intercambio (Oliveira y col., 2009).

Además de factores específicos del virus, en el proceso de *reassortment* influyen otros factores como las condiciones ambientales, el sistema inmune del huésped e, incluso en el caso de algunos virus, la posible presión selectiva que ejercen las vacunas (Wei y col., 2006). En cuanto a las condiciones ambientales, se ha descrito que, condiciones como el régimen de coinfección que a su vez depende de la distribución geográfica, pueden influir en el proceso (Díaz-Muñoz y col., 2013; Goedhals y col., 2014). En el caso del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), se ha sugerido que las condiciones de estrés y confinamiento constituyen un entorno ideal para la evolución viral y, por lo tanto, para que se produzca este fenómeno (Cárdenas y col., 2014).

Se ha propuesto que el *reassortment* facilita el salto entre especies permitiendo al virus adquirir nuevas condiciones antigénicas que le permiten infectar nuevos huéspedes (Pérez-Losada y col., 2015). Además, juega un papel importante en la emergencia y expansión de nuevas cepas, alterando la antigenicidad y/o patogenicidad (Ramig, 1997; Ohashi y col., 2004; Nikolakaki y col., 2005). Se ha descrito en diversas familias la aparición de nuevos fenotipos tras el proceso de *reassortment* entre cepas altamente patogénicas y cepas avirulentas (Le Nouën y col., 2006; Wei y col., 2008; Kirsanovs y col., 2010; Coetzee y col., 2014; Park y col., 2014), sugiriendo una modificación de la virulencia mediante este proceso de evolución.

La implicación del *reassortment* en la virulencia en acuabirnavirus, ya ha sido propuesta por nuestro grupo en varias ocasiones (Lago y col., 2010; 2013). Por ello, ante los resultados poco concluyentes de la primera parte del estudio, nos planteamos un nuevo objetivo para esta fase, que es determinar el mecanismo (aleatorio o dirigido) de

encapsidación de segmentos, analizar la frecuencia de *reassortment* en condiciones *ex vivo* y su posible efecto sobre la virulencia del virus. Los datos resultantes de este capítulo fueron publicados en el artículo “In vitro reassortment between Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) strains: The mechanisms involved and its effect on virulence” que se puede consultar en el Anexo de esta tesis.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Líneas celulares, cepas virales y titulación viral

Para la producción y titulación viral se usaron monocapas semiconfluentes de BF-2 (Tronco caudal de blueguill, *Lepomis macrochirus*) y CHSE-214 (embrión de salmón chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*), que se cultivaron a 20 °C y 15 °C respectivamente, en medio esencial de Eagle (EMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

La producción viral se llevó a cabo en frascos de 25 cm² usando las cepas 19G4, 20G3 y 20G7, tres aislados naturales obtenidos de gallineta (*Sebastes mentella*), procedente del Flemish Cap (Terranova), que se corresponden con los tipos WB/WB, Ab/Ab y WB/Ab respectivamente (segmento A/segmento B), (Romero-Brey y col., 2009). Además, para los estudios de coinfección y generación de recombinantes *ex vivo*, se llevó a cabo también la propagación de las cepas de referencia de IPNV Ab, C1, Sp y WB.

Para los ensayos de *reassortment in vitro*, se usaron dos clones de BF-2: uno con más de 200 pases, que en adelante se denominará “clon viejo”, y un nuevo clon (“clon nuevo”) comprado *ex profeso* a la ECACC.

La titulación viral se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, mediante el método de dosis infectiva 50 o TCID₅₀/ml. Para ello, se realizaron diluciones seriadas del virus en tampón de Earle suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Cada dilución se inoculó por triplicado y las células se incubaron a 15 °C durante 10 días, tras los cuales se leyó el título viral por el método de Reed y Muench (1938).

2.2.2 *Reassortment in vitro*

Se llevaron a cabo cuatro sets de coinfección, los cuales se indican en la Tabla 8, en tapices celulares en frascos de 25 cm², a una multiplicidad de infección (MOI) entre 0,01 y 0,1 virus/célula:

- A. *Coinfecciones en CHSE-214 y secuenciación por método Sanger*: Se llevaron a cabo las coinfecciones Ab:WB, Ab:Sp y Sp:WB a ratio 1:1 (igualando el título viral) y una segunda ronda con la coinfección Ab:2WB (ratio 1:2). Tras visualizar el efecto citopático (ECP), la suspensión viral se clonó en placas de 48 pocillos usando el mismo clon de células y el método de punto final de diluciones seriadas. Para ello, se aplicaron diluciones seriadas de cada coinfección y se inocularon 5 réplicas de cada una por placa (diluciones 10⁻³ a 10⁻¹⁰), en un total de 10 placas, para disponer de 50 clones para secuenciar. Las placas se incubaron durante 10 días a 15 °C y, tras la incubación, se recogió el último pocillo con ECP en cada dilución (asumiendo que el ECP de ese pocillo se debe a la replicación de una única partícula viral) y se analizó mediante secuenciación por el método de Sanger, previa amplificación por RT-PCR. Para ello, se llevó a cabo la extracción del RNA viral usando el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, y eluyendo el RNA final en 50 µl de H₂O libre de RNasas. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 20 µl: 9 µl de RNA, 1 µl de Random Primers (en un primer paso) y 4 µl de tampón 5X, 1 µl de DTT, 1 µl de dNTPs, 0,2 µl de transcriptasa inversa SSIII y 3,8 µl de agua libre de RNasas. La PCR se llevó a cabo con el kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega); para ello, se preparó una mezcla de reacción con 4 µl de cDNA, 10 µl de tampón de PCR 5X Green GoTaq®, 5 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTP, 0,5 µl de cada cebador, 0,25 µl de Go Taq Flexi DNA polimerasa y

H₂O libre de RNasas hasta 50 µl. Para la amplificación se usó la pareja de cebadores descrita por Heppell y col. (1992), 5'AGAGATCACTGACTTCACAAGTGAC 3'(forward) y 5' CTCAGTAGAAAGGACACCACGTGT 3' (reverse) para el segmento A, y la pareja 5' GAATCCMAACAAGACTCC 3' (forward) y 5' CACCATTGATAGYARTAGG 3' (reverse), en posiciones 643 y 1105 en la cepa Jasper (M58756), para el segmento B. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% mediante tinción con Red Safe (iNtRON Biotechnology) y recuperados usando el kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up de Machery Nagel (siguiendo las instrucciones del fabricante). Los fragmentos purificados se sometieron a secuenciación mediante el método de Sanger, usando el kit Genome Lab TM DTCS-Quick Start (Beckman) con mezclas de reacción compuestas por una cantidad de 10 ng de DNA por cada 100 pb de fragmento a secuenciar, 4 µl de DTCS, 1 µl de Sequencing Reaction Buffer, 1 µl de cada uno de los cebadores y agua libre de RNasas hasta 20 µl. El producto de amplificación fue precipitado en etanol al 95% (a -20 °C) (añadiendo por reacción 2 µl de acetato sódico, 2 µl de EDTA y 1 µl de glucógeno) y centrifugando a 18000 g durante 15 min. Posteriormente, se hicieron dos lavados con etanol al 75% (a -20 °C), centrifugando a 18000 g 2 min, para eliminar los nucleótidos no incorporados. El DNA se secó en SpeedVac (Savant) y se resuspendió en 40 µl de tampón SLS (Beckman). Por último, se desnaturalizó a 92 °C durante 2 min y se analizó en un secuenciador CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron utilizando los programas SeqMan y MegAlin del software Lasergene.

- B. *Coinfecciones en BF2-clon viejo y secuenciación por método Sanger:* Utilizando un clon viejo de células BF-2, se llevaron a cabo las coinfecciones Ab:WB, Sp:Ab y

Sp:WB a ratios 1:1, y un segundo set de coinfecciones Ab:2Sp (1:2) y 2Ab:WB y 2Sp:WB (2:1). La progenie fue clonada y secuenciada como se describió en el apartado anterior.

- C. *Coinfecciones en BF2-clon nuevo y secuenciación por método Sanger*: Usando un clon nuevo de células BF-2, se llevaron a cabo 6 coinfecciones diferentes: las tres coinfecciones a ratio 1:1 descritas en los pasos anteriores, Ab:WB, Sp:Ab y Sp:WB, y una nueva coinfección de estas tres cepas con la cepa C1 (Ab:C1, WB:C1 y Sp:C1). El método de clonación y secuenciación fue el mismo que en los apartados anteriores.
- D. *Coinfecciones en BF2-clon nuevo y secuenciación por método Illumina*: Empleando un clon nuevo de células BF-2, se realizaron las coinfecciones Ab:WB, Sp:Ab y Sp:WB, Ab:C1, WB:C1 y Sp:C1. Para el análisis de la progenie resultante, se realizó la extracción de RNA a partir del virus crudo (sin clonación), y a continuación se llevó a cabo la amplificación de fragmentos genómicos de ambos segmentos mediante PCR, del modo descrito anteriormente y usando la pareja de cebadores: 5'AAAGGCATGGGGCTGGAGAG 3' (forward) y 5'TGTGCACCACAGGAAAGATGACTC 3' (reverse) para el segmento A, en posiciones 1439 y 1761 en la secuencia de la cepa Jasper (M18049), y para el segmento B 5'GAATCCMAACAAGACTCC 3' (forward) y 5'GTAGGGTAGGCCGGCTGAGGACTT 3' (reverse), en posiciones 643 y 853 en la cepa Jasper (M58756); todos marcados mediante la adición en el extremo 5' de las colas: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG y GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG para cebadores forward y reverse, respectivamente. Los productos de amplificación se purificaron con el kit comercial Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey

Naguel) y se analizaron mediante el sistema de secuenciación MiSeq, mediante librerías illumina (Sistemas Genómicos).

Para analizar la distribución de los distintos tipos virales en la progenie, se analizaron los porcentajes obtenidos por el método de secuenciación Illumina, aplicando un algoritmo matemático desarrollado específicamente para este análisis (David Pazos).

Tabla 8. Coinfecciones llevadas a cabo y método de análisis para cada una de ellas:

Coinfección	Línea celular	Ratio	Análisis	Experimento
Ab+Sp	CHSE-214	1:1	Clonación-secuenciación	A
	BF-2	1:1-1:2		B
	BF-2*	1:1		C
Ab+WB	CHSE-214	1:1- 1:2	Clonación-secuenciación	A
	BF-2	1:1- 2:1		B
	BF-2*	1:1		C
Sp+WB	CHSE-214	1:1	Clonación-secuenciación	A
	BF-2	1:1- 2:1		B
	BF-2*	1:1		C
Ab+C1	BF-2*	1:1	Clonación-secuenciación	C
Sp+C1	BF-2*	1:1	Clonación-secuenciación	C
WB+C1	BF-2*	1:1	Clonación-secuenciación	C
Ab+Sp	BF-2*	1:1	Sec. Librerías Illumina	D
Ab+WB	BF-2*	1:1	Sec. Librerías Illumina	D
Sp+WB	BF-2*	1:1	Sec. Librerías Illumina	D
Ab+C1	BF-2*	1:1	Sec. Librerías Illumina	D
Sp+C1	BF-2*	1:1	Sec. Librerías Illumina	D
WB+C1	BF-2*	1:1	Sec. Librerías Illumina	D

BF2*nuevo clon celular

2.2.3 Análisis estadístico

Los porcentajes de distribución de los segmentos A y B de cada población originada por coinfección se compararon estadísticamente con los valores esperados en un proceso de *reassortment* aleatorio, con el fin de determinar si la encapsidación de estos segmentos se realiza de modo dirigido o al azar. Para ello, se aplicó un test chi-cuadrado (χ^2) usando el programa GraphPad Prism vs 7.0 (La Jolla California USA).

2.2.4 Replicación diferencial *ex vivo*

Tras el proceso de clonación en los primeros dos experimentos, se seleccionó un clon recombinante originado por cada una de las coinfecciones: WB/Ab, Ab/Sp y WB/Sp (segmento A/ segmento B) y se inocularon junto con las tres cepas de referencia en placas de 48 pocillos, a MOI 0,1 virus/célula (6 réplicas por cepa) con monocapas confluentes del tipo de célula correspondiente en cada caso. Se recogió un pocillo inoculado de cada cepa a tiempos pre- y post- adsorción (1 h) y una vez observado el ECP.

Al final del experimento cada una de las alícuotas obtenidas se tituló por triplicado mediante el método de TCID₅₀/ml, en placas de 96 pocillos con monocapas confluentes del correspondiente tipo celular, con el fin de comparar la capacidad de adsorción y de replicación de cada una de las cepas.

2.2.5 Replicación diferencial *in vivo*

El análisis del efecto del *reassortment* sobre la virulencia de birnavirus acuáticos se llevó a cabo de dos maneras, en primer lugar, comparando la virulencia entre cepas recombinantes y no recombinantes aisladas de peces salvajes y, en segundo lugar, evaluando la virulencia de cepas recombinantes obtenidas por el proceso de coinfección y clonación, y comparándola con la virulencia de cepas de referencia.

El análisis de virulencia de las cepas salvajes se llevó a cabo en 6 experimentos de infección en rodaballo (*Scophthalmus maximus*), uno en salmón atlántico (*Salmo salar*) y uno en lenguado (*Solea senegalensis*).

La comparación de la virulencia de las cepas de referencia y sus cepas recombinantes obtenidas por coinfección y clonación se hizo mediante dos experimentos de infección, uno en salmón atlántico y otro en lenguado (Tabla 9).

Tabla 9. Experimentos realizados para analizar el efecto del *reassortment* en la virulencia

Exp. ¹	Especie	Nº peces ²	Cepas ³	Vía ⁴	Dosis	Tiempo
1	Rodaballo (25 g)	20	19G4, 20G3, 20G7	i.p.	10 ⁷	60
2	Rodaballo (25 g)	20	19G4, 20G3, 20G7	i.p.	10 ⁵	60
3	Rodaballo (5 g)	30	19G4, 20G3, 20G7	baño	10 ⁵	50
4	Rodaballo (25 g)	40	19G4, 20G3, 20G7	i.p.	10 ⁵	25
5	Rodaballo (25 g)	40	19G4, 20G3, 20G7	i.p.	10 ⁵	25
6	Rodaballo (25 g)	30	19G4, 20G3, 20G7	i.p.	10 ⁵	30
7	Salmón (7 cm)	60	19G4, 20G3, 20G7	i.p.	10 ⁵	35
8	Lenguado (2 g)	50	19G4, 20G3, 20G7	i.p.	10 ⁵	40
9	Salmón (7 cm)	40	Ab,Sp,WB, WB/Ab, Ab/Sp WB/Sp	i.p.	10 ⁵	40
10	Lenguado (2 g)	30	Ab,Sp,WB, WB/Ab, Ab/Sp WB/Sp	i.p.	10 ⁵	30

1. Experimento. 2. Número de peces infectados por cepa. 3. 19G4 (WB/WB), 20G3 (Ab/Ab), 20G7 (WB/Ab) 4. Vía de infección: i.p: inyección intraperitoneal o baño (inmersión).

* La zona sombreada representa los experimentos llevados a cabo con las cepas de referencia y sus recombinantes obtenidos por coinfección-clonación.

Todos los peces procedían de piscifactorías monitorizadas por nuestro laboratorio durante años y declaradas libres de virus. Tras su transporte, fueron aclimatados en las instalaciones del acuario de la USC al menos 7 días. Durante este tiempo se mantuvieron a un máximo de densidad de 100 peces por cada 100 litros de agua, a 15 °C, en continua aireación y con alimentación comercial. Previo a la infección, se testaron 5 individuos por especie, mediante RT-PCR y nested-PCR para los virus IPNV, virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus de la

necrosis nerviosa viral (VNNV) y virus de la necrosis hematopoyética viral (IHNV).

Todos los peces se inocularon mediante inyección intraperitoneal, a excepción del experimento número 3, donde la infección se realizó por baño, debido al pequeño tamaño de los rodaballos. Las inyecciones intraperitoneales se realizaron con 0,1 ml de virus a dosis 10^5 TCID₅₀/ml y 10^7 TCID₅₀/ml para el experimento 1. En el experimento 3 la infección se realizó por inmersión, sumergiendo los peces en 3 litros de agua con virus a una dosis de 10^5 TCID₅₀/ml, durante 3 horas y, transcurrido este tiempo, se añadió agua a los tanques. En cada experimento se dejó un grupo control de 20 individuos inoculados con tampón EMEM de la misma manera que los grupos problema. Tras la infección, los peces se distribuyeron en lotes de igual tamaño nombrados con el nombre de la cepa correspondiente y se mantuvieron a 15 °C hasta el final del experimento (tiempos entre 25 y 60 días, dependiendo del experimento), revisándolos diariamente para detectar síntomas de la enfermedad y recoger las bajas. Los peces muertos se recogieron diariamente y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis. Al final de cada experimento, los supervivientes se sacrificaron con una sobredosis de anestésico MS-222 (Sigma).

Durante todo el experimento, se siguieron todos los protocolos de buenas prácticas para animales de experimentación recogidos en la directiva 2010/63/UE (protocolo aprobado por la Xunta de Galicia) con el fin de minimizar el sufrimiento animal durante el tiempo de experimentación.

2.2.6 Detección y aislamiento viral a partir de tejido

Todos los peces se analizaron en lotes de 5 individuos; en el caso de los peces de mayor tamaño se muestreó corazón, riñón y bazo; en los experimentos 3, 8 y 10, se muestreó toda la cavidad peritoneal (con todos los órganos, intentando descartar la vesícula biliar). El procedimiento llevado a cabo fue el descrito por Ledo y col. (1987), en el que los tejidos correspondientes se extrajeron asépticamente y se introdujeron en una bolsa de *stomacher*, donde se homogenizaron con rodillo manual en tampón Earle's (1:10, peso/volumen) suplementado con 1000 IU de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 500 µg/ml de

gentamicina y 10 µg/ml de amfotericina. A continuación, tras una nueva homogenización, las suspensiones se centrifugaron a 7500 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se recogió, se incubó a 4 °C durante 24 h y se guardó a -80 °C hasta la aplicación de aislamiento en cultivo celular, RT-PCR y nested-PCR.

Para el análisis por RT-PCR se siguió el protocolo ya descrito en el apartado 2.2.2, pero en esta ocasión los cebadores usados fueron 5' AGAGATCACTGACTTCACAAGTGAC 3' (forward) y 5' CTCAGTAGAAAGGACACCACGTGT 3' (reverse), descritos por Heppell y col. (1992).

La nested-PCR se realizó de la misma manera que la PCR, partiendo de 4 µl de producto de PCR y usando la pareja de cebadores 5' AAAGGCATGGGGCTGGAGAG 3'(forward) y 5' CTCCGCTTGCCCAGGACTC 3' (reverse) en posiciones 1439 y 1718 en la secuencia genómica de la cepa Jasper (M18049).

Los productos de PCR y nested-PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con Red Safe (iNtRON Biotechnology) y se visualizaron por exposición a luz UV en un transiluminador.

Para el aislamiento en cultivo celular, los homogenados clarificados se diluyeron 1:10 y 1:100 en tampón Earle's suplementado con antibióticos, y se inocularon 100 µl de cada dilución, por duplicado, en placas de 48 pocillos con monocapas semiconfluentes de la línea BF-2. Como control positivo se inoculó una cepa de referencia de IPNV; como control negativo se mantuvieron dos pocillos inoculados con Earle's. La incubación se realizó a 15 °C durante 10 días, tiempo tras el cual se realizó un segundo pase. Tras la destrucción del tapiz celular, se recogió el contenido del pocillo (virus crudo) y se realizó un segundo y tercer pase (de ser necesario) del mismo modo, considerándose positivas aquellas muestras con dos pases con ECP. La presencia del virus en los lotes considerados positivos se confirmó mediante RT-PCR y nested-PCR (con el mismo protocolo descrito en apartados anteriores).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Porcentajes de *reassortment* tras la coinfección

La tasa de *reassortment* observada en la línea celular CHSE (mediante la secuenciación de Sanger) a ratios 1:1 fue relativamente baja, de tan solo 10%. En el caso de la línea celular BF-2 se observó una clara diferencia entre los clones usados, no habiéndose detectado ningún recombinante a ratio 1:1 usando el clon viejo, mientras que el porcentaje de recombinantes en el clon celular nuevo asciende al 20,3% en el caso de las coinfecciones realizadas con las cepas Ab, WB y Sp; el porcentaje total de cepas recombinantes asciende al 28,5% si incluimos las coinfecciones realizadas con la cepa C1 y las anteriores. El porcentaje de *reassortment* por el método de librerías Illumina fue similar, un 27,6%; sin embargo, este método permitió la detección de un mayor número de tipos virales en la progenie, ya que permitió detectar las combinaciones minoritarias.

Los resultados observados en los distintos experimentos de coinfección se muestran en la Figura 12, donde se indican los distintos tipos virales observados en las progenies como Segmento A/Segmento B.

En las coinfecciones en CHSE-214 (llevadas a cabo con las cepas WB, Ab y Sp) trabajando a ratio 1:1, solo se detectaron virus recombinantes en la progenie originada con la coinfección Sp+WB (30% WB/Sp y 70% Sp/Sp). Las coinfecciones llevadas a cabo con las cepas Ab y WB llevaron a la formación del tipo parental Ab (100%) cuando se coinfectaba a ratio 1:1, mostrando una progenie 91% WB/Ab y 9% WB/WB a ratio 1Ab:2WB. Los porcentajes observados en la progenie originada por coinfección Ab+Sp fueron 77% Ab/Ab y 23% Sp/Sp (Figura 12, Exp-A).

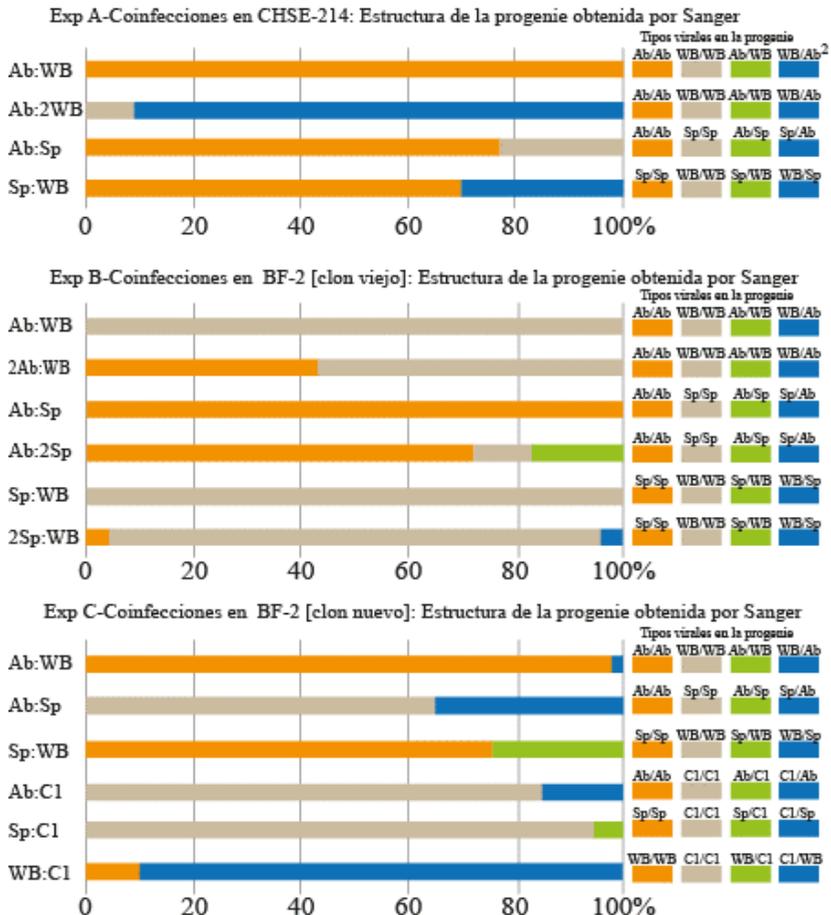
En las coinfecciones en BF-2, la aparición de cepas recombinantes depende claramente del número de pases del clon utilizado. Así, en el experimento realizado con el clon celular viejo, las progenies detectadas tras la coinfección con las cepas Ab, WB y Sp a ratios 1:1 están compuestas únicamente de tipos parentales (100% WB/WB en las coinfecciones Ab+WB y Sp+WB y 100% Ab en Ab+Sp), siendo necesario duplicar la dosis de una de las cepas en cada coinfección para

detectar otros tipos virales. A ratios 2:1, además de los tipos parentales, se detectaron virus recombinantes en el caso de las coinfecciones Ab+Sp y Sp+WB; los porcentajes observados fueron 57% WB/WB y 43% Ab/Ab en la coinfección 2Ab+WB, 72% Ab/Ab, 11% Sp/Sp y 17% Ab/Sp en la coinfección Ab+2Sp, y 92% WB/WB, 4% WB/Sp y 4% Sp/Sp en la coinfección 2Sp+WB (Figura 12, Exp-B).

Trabajar con un nuevo clon de esta línea celular permitió la detección de un mayor número de cepas recombinantes con cualquiera de los dos métodos de secuenciación utilizados, Sanger e Illumina, siendo el segundo de los métodos el que permitió detectar un mayor número de tipos virales. En los experimentos C y D realizados con el clon nuevo, se añadió la cepa C1 en las coinfecciones. En el caso de la secuenciación por el método de Sanger (Figura 12, Exp-C) los porcentajes observados fueron 98% Ab/Ab y 2% WB/Ab en la coinfección Ab+WB, 65% Sp/Sp y 35% Sp/Ab en la coinfección Ab+Sp, y 76% Sp/Sp y 24% Sp/WB en Sp+WB. El número de tipos recombinantes detectados fue mayor en el caso de las coinfecciones realizadas con estas tres cepas y la cepa C1: en la coinfección con la cepa Ab se observaron porcentajes de 85% C1/C1 y 15% C1/Ab; en la coinfección con Sp los porcentajes fueron 95% C1/C1 y 5% Sp/C1; observándose el porcentaje de recombinantes más elevado en la tercera de las coinfecciones, realizada con la cepa WB, donde el 90% de la progenie mostró un patrón C1/WB y el otro 10% un WB/WB.

Mediante el método de secuenciación por librerías Illumina (aplicado en las coinfecciones con las cepas Ab, Sp, WB y C1) se obtuvieron los porcentajes del tipo de cada segmento genómico presente en la progenie de la coinfección. Para poder entender la distribución de cada uno de los tipos de segmentos genómicos y tipar las poblaciones resultantes, se desarrolló un algoritmo que proporciona todas las combinaciones posibles en función de los porcentajes observados (David Pazos). Así, en la coinfección C1+Ab se observó una progenie constituida por un 83,95-84,63% de tipo C1/C1, 14,69-15,37% de C1/Ab y un de 0-0,68% Ab/Ab y Ab/C1. En el caso de la coinfección C1+Sp, la progenie resultante fue 94,33% C1/C1 y 5,67% Sp/C1. La progenie de la coinfección C1+WB estaba formada por un 90,27-90,64% de cepas C1/WB, un 8,99-9,36% de cepas WB/WB y un

0-0,37% de cepas C1/C1 y WB/C1. En el caso de la coinfección Ab+Sp, la progenie resultante estaba formada por un 65,62-66,78% de cepas tipo Sp/Sp, un 32,06-33,22% de tipo Sp/Ab, y 0-1,16% de cepas tipo Ab/Ab y Ab/Sp. Para la coinfección Ab+WB, los porcentajes observados fueron 99,61-99,62% Ab/Ab, 0,37-0,38% WB/Ab, y 0-0,01% Ab/WB y WB/WB. Por último, los porcentajes de la coinfección Sp+WB fueron 75-77,8% Sp/Sp, 19,4-22,2% Sp/WB y 0-2,8% de WB/WB y WB/Sp (Figura 12, Exp-D).



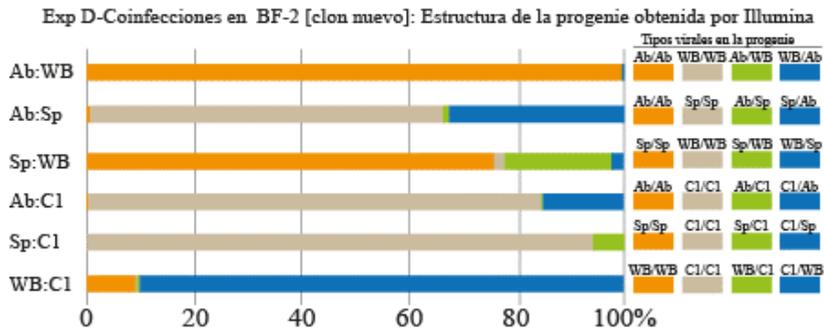


Figura 12. Distribución de los tipos virales en las progenies obtenidas por coinfección de dos cepas de IPNV. Exp A- Secuenciación Sanger de las coinfecciones entre cepas de los tipos Ab, WB y Sp en la línea celular CHSE-214. Exp B- Secuenciación Sanger de las coinfecciones entre cepas de los tipos Ab, WB y Sp en el clon celular viejo de BF-2. Exp C- Secuenciación Sanger de las coinfecciones entre cepas de los tipos Ab, WB, Sp y C1 en el clon nuevo de BF-2. Exp D- Progenies detectadas mediante secuenciación Illumina de las coinfecciones entre cepas de los tipos Ab, WB, Sp y C1 en el clon nuevo de la línea BF-2. *Genoma del tipo viral: Segmento A/Segmento B.

Cabe destacar que los porcentajes observados en las coinfecciones realizadas en el clon nuevo de la línea BF2 fueron similares independientemente del método de secuenciación utilizado. Sin embargo, queda demostrado que el método Illumina permite detectar tipos virales minoritarios que no pueden ser detectados por Sanger.

2.3.2 Análisis estadístico

En el análisis estadístico se compararon las proporciones de cada uno de los tipos de segmentos virales con los esperados en un proceso de distribución *random*, o al azar, donde las proporciones de cada uno de los tipos de cada segmento genómico se corresponderían con un 50% [50:50/50:50 (seg. A/seg. B) en coinfecciones 1:1; 40:60/40:60 en coinfecciones 1:2; 60:40/60:40, en coinfecciones 2:1].

Como se puede observar en la Tabla 10, todas las proporciones, con excepción de las obtenidas en la coinfección 2Ab/WB del Exp. B fueron significativamente diferentes de los valores esperados por un modelo de empaquetamiento aleatorio ($p < 0,0001$), pudiendo descartarse así que la recombinación de estos segmentos se produce por un mecanismo aleatorio.

Tabla 10. Análisis estadístico χ^2 de la distribución de segmentos genómicos en la progeñe, asumiendo como H_0 : distribución aleatoria de segmentos.

Exp A: Sanger en CHSE						
Coinfección	Segmento A		Segmento B		P	Interpretación
Ab:WB	Ab	WB	Ab	WB	<0,0001	No-aleatoria
	100	0	100	0		
Ab:2WB	Ab	WB	Ab	WB	<0,0001	No-aleatoria
	0	100	91	9		
Ab:Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	<0,0001	No-aleatoria
	77	23	77	23		
Sp:WB	Sp	WB	Sp	WB	<0,0001	No-aleatoria
	70	30	100	0		

Exp B: Sanger en BF-2 [clon viejo]						
Coinfección	Segmento A		Segmento B		P	Interpretación
Ab:WB	Ab	WB	Ab	WB	<0,0001	No-aleatoria
	0	100	0	100		
2Ab:WB	Ab	WB	Ab	WB	0,2702	H_0 (aleatoria) no descartable
	43	57	43	57		
Ab:Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	<0,0001	No-aleatoria
	100	0	100	0		
Ab:2Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	<0,0001	No-aleatoria
	89	11	72	28		
Sp:WB	Sp	WB	Sp	WB	<0,0001	No-aleatoria
	0	100	0	100		
2Sp:WB	Sp	WB	Sp	WB	<0,0001	No-aleatoria
	4	96	8	92		

Exp C: Sanger en BF-2 [clon nuevo]						
Coinfección	Segmento A		Segmento B		P	Interpretación
Ab:WB	Ab	WB	Ab	WB	<0,0001	No-aleatoria
	98	2	100	0		
Ab:Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	<0,0001	No-aleatoria
	0	100	35	65		
Sp:WB	Sp	WB	Sp	WB	<0,0001	No-aleatoria
	100	0	76	24		
Ab:C1	Ab	C1	Ab	C1	<0,0001	No-aleatoria
	0	100	15	85		
Sp:C1	Sp	C1	Sp	C1	<0,0001	No-aleatoria
	5	95	0	100		
WB:C1	WB	C1	WB	C1	<0,0001	No-aleatoria
	10	90	100	0		

Exp D: Illumina en BF-2[clon nuevo]						
Coinfección	Segmento A:		Segmento B		P	Interpretación
Ab:WB	Ab	WB	Ab	WB	<0,0001	No-aleatoria
	99.62	0.38	99.99	0.01		
Ab:Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	<0,0001	No-aleatoria
	1.16	98.84	31.58	68.41		
Sp:WB	Sp	WB	Sp	WB	<0,0001	No-aleatoria
	97.17	2.83	77.84	22.16		
Ab:C1	Ab	C1	Ab	C1	<0,0001	No-aleatoria
	0.68	99.32	15.37	84.63		
Sp:C1	Sp	C1	Sp	C1	<0,0001	No-aleatoria
	5.67	94.33	0	100		
WB:C1	WB	C1	WB	C1	<0,0001	No-aleatoria
	9.36	90.64	99.63	0.37		

Para determinar si existe algún tipo de asociación entre segmentos genómicos que pueda afectar al proceso de recombinación, se aplicó un segundo test estadístico basado en el estudio de Lubeck y col. (1979). Para ello, con las frecuencias de los distintos tipos virales observados en la progenie en los experimentos A-C se calcularon las frecuencias de todos los tipos virales esperados mediante un proceso de encapsidación aleatoria (multiplicando las frecuencias de cada segmento con cada tipo viral posible) y comparando las distribuciones mediante un test χ^2 , asumiendo que H_0 : *no hay diferencias en la distribución*, corresponde con un proceso aleatorio en el que no hay ningún tipo de asociación entre segmentos genómicos (Tabla 11).

En el caso de las coinfecciones en las que se produce ausencia de alguno de los tipos virales en la progenie, se asume que las frecuencias virales esperadas son iguales a las observadas por lo que no puede aplicarse el análisis de Lubeck.

Para justificar esto, se aplica la siguiente deducción matemática (desarrollada por Carlos Pereira Dopazo para la publicación) en una coinfección entre cepas A1/B1:A2/B2:

I) Frecuencias virales observadas en la progenie
 $f_o(A1B1) / f_o(A1B2) / f_o(A2B1) / f_o(A2B2)$

II) Frecuencias virales de cada segmento deducidas en la progenie

$$f(A1) = f_o(A1B1) + f_o(A1B2)$$

$$f(A2) = f_o(A2B1) + f_o(A2B2)$$

$$f(B1) = f_o(A1B1) + f_o(A2B1)$$

$$f(B2) = f_o(A1B2) + f_o(A2B2)$$

III) Frecuencias esperadas en la progenie (calculadas a partir de la frecuencia de los segmentos)

$$f_e(A1B1) = f(A1) \cdot f(B1)$$

$$f_e(A1B2) = f(A1) \cdot f(B2)$$

$$f_e(A2B1) = f(A2) \cdot f(B1)$$

$$f_e(A2B2) = f(A2) \cdot f(B2)$$

IV) Si uno de los tipos virales no aparece en la progenie (por ejemplo, si $B_2=0$) no pueden representarse los tipos virales observados con B_2 , afectando a las ecuaciones de la sección II:

$$f_o(A1B2) = 0 \Rightarrow f(A1) = f_o(A1B1)$$

$$f_o(A2B2) = 0 \Rightarrow f(A2) = f_o(A2B1)$$

Ni tampoco podrían representarse los tipos virales con B_2 en las ecuaciones de la sección III, si $f(B_2) = 0$

$$f_e(A1B2) = 0, \text{ and } f_e(A2B2) = 0$$

V) Esto significa que en la sección III, solo pueden usarse dos ecuaciones

$$f_e(A1B1) = f(A1) \cdot f(B1) \Rightarrow f(B1) = f_e(A1B1) / f(A1)$$

$$f_e(A2B1) = f(A2) \cdot f(B1) \Rightarrow f(B1) = f_e(A2B1) / f(A2)$$

entonces,

$$f_e(A1B1) / f(A1) = f_e(A2B1) / f(A2)$$

y usando las ecuaciones de la sección IV.1,

$$f_e(A1B1) / f_o(A1B1) = f_e(A2B1) / f_o(A2B1)$$

Entonces, si no hay virus tipo B_2 (tanto observado, como esperado; sección IV),

$$f_e(A1B1) + f_e(A2B1) = 1 \Rightarrow f_e(A2B1) = 1 - f_e(A1B1)$$

$$f_o(A1B1) + f_o(A2B1) = 1 \Rightarrow f_o(A2B1) = 1 - f_o(A1B1)$$

entonces,

$$f_e(A1B1) / f_o(A1B1) = [1 - f_e(A1B1)] / [1 - f_o(A1B1)] \Rightarrow$$

$$f_e(A1B1) - f_e(A1B1) \cdot f_o(A1B1) = f_o(A1B1) - f_e(A1B1) \cdot f_o(A1B1)$$

y finalmente:

$$f_e(A1B1) = f_o(A1B1)$$

En todos los demás casos en los que el análisis pudo ser aplicado, la hipótesis nula H_0 se rechazó con una $p < 0,0001$, por lo que puede descartarse un proceso de empaquetamiento de segmentos *random* o al azar.

Debemos destacar que hay una diferencia a tener en consideración entre los experimentos C y D. En ambos se analizan las mismas coinfecciones pero mediante distintos métodos. En el experimento C se analizó la progenie resultante mediante secuenciación Sanger, tras haber hecho clonación. Esto implica que los segmentos genómicos analizados estaban encapsidados dentro de partículas infectivas completas. En el experimento D se analizó la progenie mediante secuenciación Illumina, sin haber hecho clonación, lo que significa que los segmentos analizados serían tanto encapsidados como sin encapsidar. Por ello, se hizo un último análisis de las frecuencias observadas en estos dos experimentos, considerando H_0 : *no hay diferencias entre las dos distribuciones*, para demostrar que no hay una selección específica o preferencia en la encapsidación de un tipo viral frente a otro (Tabla 12). El resultado demostró que no se puede rechazar la hipótesis nula ($p > 0,05$), por lo que no podemos descartar que el empaquetamiento de segmentos se realice por un mecanismo aleatorio, o al azar.

Finalmente, se realizó un último análisis estadístico cuyos resultados se muestran en la Tabla 13; la finalidad en este caso fue demostrar si el tipo de progenie viral observada dependía del tipo celular utilizado para la coinfección. El análisis reveló diferencias significativas en todos los casos, a excepción de la coinfección Ab:WB en las líneas CHSE-214 y BF-2 “clon viejo” ($p = 0,7968$ y $p = 0,5102$, respectivamente).

2.3.3 Infectividad *in vitro*

Como se muestra en la Tabla 14, todas las cepas mostraron altas tasas de adsorción en las distintas líneas celulares ensayadas. Los tres tipos salvajes y el recombinante Ab/Sp mostraron tasas en torno a 75% e incluso superior, correspondiendo los valores de adsorción más bajos a las cepas recombinantes con segmento A tipo WB (WB/Ab y WB/Sp) (en torno a 40-50%).

A pesar de las diferencias en la adsorción, todas las cepas mostraron niveles similares de replicación, alcanzando títulos de en torno a 10^8 - 10^9 TCID₅₀/ml, siendo incluso más alto en el caso de la cepa Sp/Ab. A pesar de la alta capacidad replicativa, se observaron

diferencias entre los clones al analizar su tasa de producción de partículas virales en la progenie, con respecto a las parentales (tasa de producción; calculada con el cociente entre los títulos tras ECP y el virus fijado); en este aspecto, son los recombinantes con segmento B tipo Sp (WB/Sp y Ab/Sp) los que muestran las tasas de producción más bajas, por debajo de 15000 progenie/parental (pg/pr).

Los tipos WB/WB, Ab/Ab y WB/Ab, mostraron las mayores tasas de producción, en CHSE-214: ≥ 50000 pg/pr.

Cabe destacar que las cepas tipo Sp, con la mayor capacidad de adsorción (>90%), mostraron las menores tasas de producción en ambos tipos celulares (342 pg/pr y 494 pg/pr, respectivamente).

Mediante el cálculo de las tasas mostradas en la Tabla 14, hemos podido estimar la eficiencia de replicación de cada uno de los tipos virales de la progenie, siendo la secuencia observada: WB/Ab > WB/WB > Ab/Ab > Sp/Ab > WB/Sp > Sp/Sp.



Tabla 11. Análisis estadístico de la distribución de tipos virales en la progenie según Lubeck y col. (1979). Se aplica χ^2 con H_0 : no hay asociación entre segmentos genómicos (aleatorio).

Coif.	Frecuencias de los segmentos												P	Interpretación
	Tipos virales observados				Seg A		Seg B		Tipos virales esperados					
Exp.A: Sanger en CHSE														
Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		χ^2 no aplicable*
	100	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	*	
Ab:2WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		χ^2 no aplicable*
	0	0	91	9	0	100	91	9	0	0	91	9	*	
Ab:Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		No-aleatorio
	77	0	0	23	77	23	77	23	59,29	17,71	17,71	5,29	<0.0001	
Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		χ^2 no aplicable*
	70	0	30	0	70	30	100	0	70	0	30	0	*	
Exp.B: Sanger en BF-2 (viejas)														
Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		χ^2 no aplicable*
	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	100	*	
2Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		No-aleatorio
	43	0	0	57	43	57	43	57	18,49	24,51	24,51	32,49	<0.0001	
Ab:Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		χ^2 no aplicable*
	100	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	*	
Ab:2Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		No-aleatorio
	72	17	0	11	89	11	72	28	64,08	24,92	7,92	3,08	<0.0001	
Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		χ^2 no aplicable*
	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	100	*	
2Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		No-aleatorio
	4	0	4	92	4	96	8	92	0,32	3,68	7,68	88,32	0.0007	
Exp.B: Sanger en BF-2 (nuevas)														
Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		χ^2 no aplicable*
	98	0	2	0	98	2	100	0	98	0	2	0	*	
Ab:Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		χ^2 no aplicable*
	0	0	35	65	0	100	35	65	0	0	35	65	*	
Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		χ^2 no aplicable*
	76	24	0	0	100	0	76	24	76	24	0	0	*	
Ab:C1	Ab/Ab	Ab/C1	C1/Ab	C1/C1	Ab	C1	Ab	C1	Ab/Ab	Ab/C1	C1/Ab	C1/C1		χ^2 no aplicable*
	0	0	15	85	0	100	15	85	0	0	15	85	*	
Sp:C1	Sp/Sp	Sp/C1	C1/Sp	C1/C1	Sp	C1	Sp	C1	Sp/Sp	Sp/C1	C1/Sp	C1/C1		χ^2 no aplicable*
	0	5	0	95	5	95	0	100	0	5	0	95	*	
WB:C1	WB/WB	WB/C1	C1/WB	C1/C1	WB	C1	WB	C1	WB/WB	WB/C1	C1/WB	C1/C1		χ^2 no aplicable*
	10	0	90	0	10	90	100	0	10	0	90	0	*	

Tabla 12. Análisis estadístico para comparar las frecuencias de segmentos genómicos observados en los experimentos C y D. Se aplica χ^2 , asumiendo H_0 :no hay diferencias entre los experimentos.

	Frecuencia observada (exp C)				Frecuencia observada (exp D)				P	Interpretación
	Segmento A		Segmento B		Segmento A		Segmento B			
Ab:WB	Ab 98	WB 2	Ab 100	WB 0	Ab 99,62	WB 0,38	Ab 99,99	WB 0,01	0,0737	H_0 (aleatorio) no puede rechazarse
Ab:Sp	Ab 0	Sp 100	Ab 35	Sp 65	Ab 1,16	Sp 98,84	Ab 15,62	Sp 31,58	0,6336	H_0 (aleatorio) no puede rechazarse
Sp:WB	Sp 100	WB 0	Sp 76	WB 24	Sp 97,17	WB 2,83	Sp 77,84	WB 22,16	0,3752	H_0 (aleatorio) no puede rechazarse
Ab:C1	Ab 0	C1 100	Ab 15	C1 85	Ab 0,68	C1 99,32	Ab 15,37	C1 84,63	0,8743	H_0 (aleatorio) no puede rechazarse
Sp:C1	Sp 5	C1 95	Sp 0	C1 100	Sp 5,67	C1 94,33	Sp 0	C1 100	0,9926	H_0 (aleatorio) no puede rechazarse
WB:C1	WB 10	C1 90	WB 100	C1 0	WB 9,36	C1 90,64	WB 99,63	C1 0,37	0,9362	H_0 (aleatorio) no puede rechazarse

Tabla 13. Comparación de la progenie viral observada en las distintas líneas celulares. Se aplica χ^2 con H_0 : no hay diferencias entre líneas celulares.

Coinf.	Línea	Tipos salvajes		Recombinantes		p (comparación) ²		
						CHSE-214	BF-2[viejas]	BF-2[nuevas]
<i>Ab:WB</i>		Ab/Ab	WB/WB	Ab/WB	WB/Ab	<0,0001	<0,0001	0,5102
	CHSE-214	100	0	0	0	-	<0,0001	<0,0001
	BF-2[viejas]	0	100	0	0	<0,0001	-	<0,0001
	BF-2[nuevas]	98	0	0	2	0,7968	<0,0001	-
<i>Ab:Sp</i>		Ab/Ab	Sp/Sp	Ab/Sp	Sp/Ab	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	CHSE-214	77	23	0	0	-	<0,0001	<0,0001
	BF-2[viejas]	100	0	0	0	<0,0001	-	<0,0001
	BF-2[nuevas]	0	65	0	35	<0,0001	<0,0001	-
<i>Sp:WB</i>		Sp/Sp	WB/WB	Sp/WB	WB/Sp	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	CHSE-214	70	0	0	30	-	<0,0001	<0,0001
	BF-2[viejas]	0	100	0	0	<0,0001	-	<0,0001
	BF-2[nuevas]	76	0	24	0	<0,0001	<0,0001	-

Tabla 14. Resultados de la replicación *in vitro* de las tres cepas de referencia y sus cepas recombinantes

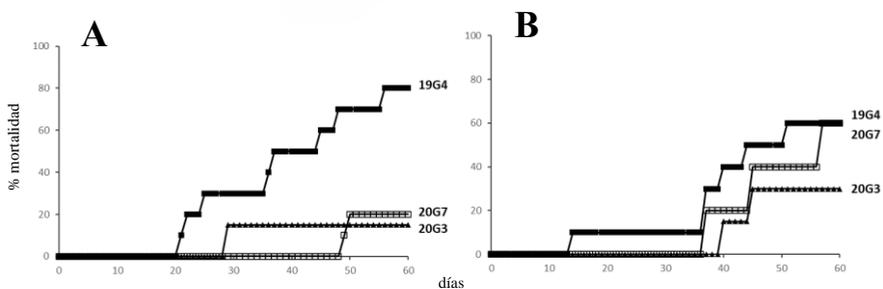
Clon	Línea cel.	Inóculo ³		Adsorción ⁴		Adsorc (%) ⁶	Producción viral ⁵			Ratio ⁸
		TCID ₅₀ /ml ¹	Log±desv ²	TCID ₅₀ /ml	Log±desv		TCID ₅₀ /ml	Log±desv	Producción ⁷	
WB/WB	CHSE-214	9,63×10 ³	3,98±0.29	7,16×10 ³	3,85±0.27	74,4	8,82×10 ⁸	8,95±0.38	1,23x10 ⁵	360
	BF-2	3,21×10 ⁴	4,51±0.36	2,49×10 ⁴	4,40±0.37	77,4	1,61×10 ⁹	9,21±0.25	6,50x10 ⁴	132*
Ab/Ab	CHSE-214	2,23×10 ⁴	4,35±0.14	1,91×10 ⁴	4,28±0.33	85,7	8,57×10 ⁸	8,93±0.41	4,49x10 ⁴	131
	BF-2	2,86×10 ⁴	4,46±0.32	2,56×10 ⁴	4,41±0.31	89,6	7,74×10 ⁸	8,89±0.06	3,02x10 ⁴	61*
Sp/Sp	CHSE-214	4,38 ×10 ⁵	5,64±0.17	4,01×10 ⁵	5,60±0.24	91,6	1,37×10 ⁸	8,14±0.29	3,42x10 ²	1
	BF-2	5,22×10 ⁵	5,72±0.22	4,87×10 ⁵	5,69±0.23	93,3	2,40×10 ⁸	8,38±0.36	4,94x10 ²	1*
WB/Ab	CHSE-214	3,97×10 ³	3,60±0.14	2,20×10 ³	3,34±0.19	55,4	3,97×10 ⁸	8,60±0.14	1,80x10 ⁵	526
WB/Sp	CHSE-214	5,50×10 ⁴	4,74±0.29	2,34×10 ⁴	4,37±0.39	42,5	1,17×10 ⁸	8,07±0.45	5,85x10 ³	17
Sp/Ab	BF-2	2,29×10 ⁵	5,36±0.43	1,85×10 ⁵	5,27±0.52	80,8	2,64×10 ⁹	9,56±0.50	1,43x10 ⁴	42 (32*)

Los resultados se expresan como media TCID₅₀/ml (1) y media Log₁₀ (TCID₅₀/ml) ± desviación entre seis réplicas del inóculo (2), tras la adsorción (3), replicación (4) y tras la aparición de ECP (5). La eficiencia de adsorción se calculó con la diferencia entre la alícuota tomada tras la adsorción y el inóculo inicial. La tasa de producción (7) se calculó mediante el cociente entre virus producidos y fijados. Por último, la tasa relativa de producción (8) se calculó mediante el cociente de cada tasa de producción y el valor más bajo observado para esta tasa (tipo Sp). Los valores con “*” se calcularon con los tipos parentales en células BF-2.

2.3.4 Infectividad *in vivo* de cepas recombinantes aisladas de peces salvajes

Las mortalidades observadas en los experimentos llevados a cabo en *Scophthalmus maximus* (rodaballo) con las tres cepas aisladas de gallineta salvaje (19G4: WB/WB, 20G3: Ab/Ab y 20G7: WB/Ab) se reflejan en la Figura 14. En los experimentos 5 y 6, llevados a cabo con rodaballo de 25 g inyectado intraperitonealmente con la dosis 10^5 TCID₅₀/ml, no se produjo mortalidad, por lo que las curvas se corresponden con los experimentos 1 a 4.

En estos experimentos, es la cepa 19G4 (tipo WB) la que alcanza mayores valores de mortalidad acumulativa final (MAc), siendo también una de las primeras en iniciar la mortalidad en la mayoría de los experimentos. Las cepas 20G3 (tipo Ab) y 20G7 (recombinante) se comportan de manera variable, dependiendo del experimento. Así, en los experimentos 2 y 3 (Figura 13B y C, respectivamente) la cepa recombinante (20G7) alcanzó valores de mortalidad acumulativa similares a los de la cepa 19G4, siendo la cepa 20G3 la que inició más tarde la mortalidad y alcanzó niveles finales inferiores. En el experimento 4, por el contrario, la que presentó valores de mortalidad más próximos a 19G4 fue la cepa 20G3, alcanzando, al igual que 19G4, un 100% de mortalidad (Figura 13D). En el primero de los experimentos, 20G3 y 20G7 presentaron niveles de mortalidad muy bajos, inferiores al 25% (Figura 13A).



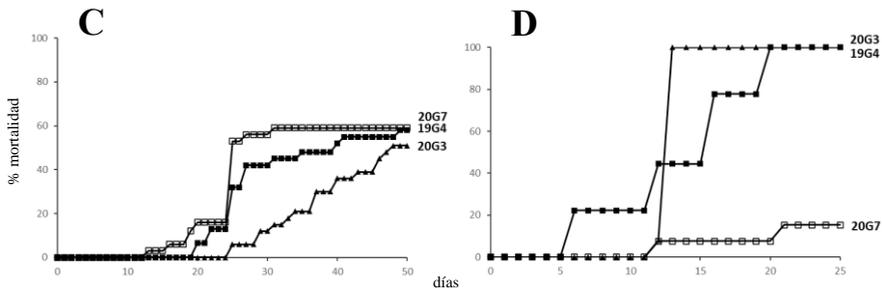


Figura 13. Curvas de mortalidad en los experimentos 1 a 4. A.-Mortalidades acumulativas con las cepas 19G4 (WB/WB), 20G3 (Ab/Ab) y 20G7 (WB/Ab) en rodaballo de 25g infectado por inyección intraperitoneal con una dosis de 10^7 TCID₅₀/ml. B.-Mortalidades acumulativas con las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 en rodaballo de 25g infectado por inyección intraperitoneal con la dosis 10^5 TCID₅₀/ml. C.-Mortalidades acumulativas con 19G4, 20G3 y 20G7 en rodaballo de 5g infectado por baño con la dosis 10^5 TCID₅₀/ml. D.-Mortalidades acumulativas con las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 en rodaballo de 25 g inoculado por inyección intraperitoneal con la dosis 10^5 TCID₅₀/ml.

En los experimentos 7 y 8, llevados a cabo con alevines de *Salmo salar* (salmón atlántico) y *Solea senegalensis* (lenguado), infectados por i.p. con las tres cepas salvajes a una dosis 10^5 TCID₅₀/ml, las mortalidades de las tres cepas fueron similares, iniciándose al mismo tiempo, alcanzando valores de mortalidad acumulativa finales similares y trazando curvas de mortalidad con patrones muy parecidos, con excepción de 20G7 (Figura 14). En salmón, las mortalidades provocadas por 19G4 y 20G3 fueron del 100%. En 20G7 aunque la mortalidad fue más pronunciada al principio, se alcanzaron valores de mortalidad acumulativa final inferiores (88,7%) (Figura 14A). Los datos de lenguados se muestran en la Figura 14B; las tres cepas iniciaron la mortalidad en los primeros 4 días p.i. Las cepas 19G4 y 20G3 mostraron una cinética de mortalidad prácticamente igual, alcanzando valores finales de mortalidad acumulativa muy elevados 90% y 96,7% respectivamente. La cepa recombinante 20G7, que provocó una mortalidad menos pronunciada, alcanzó valores de mortalidad finales del 79%.

En todos los ensayos, los peces mostraron los signos típicos de la infección, incluyendo pigmentación oscura, anorexia y natación errática. El virus se aisló en cultivo celular a partir de todos los lotes y se detectó por RT-PCR a partir de tejido y del cultivo celular.

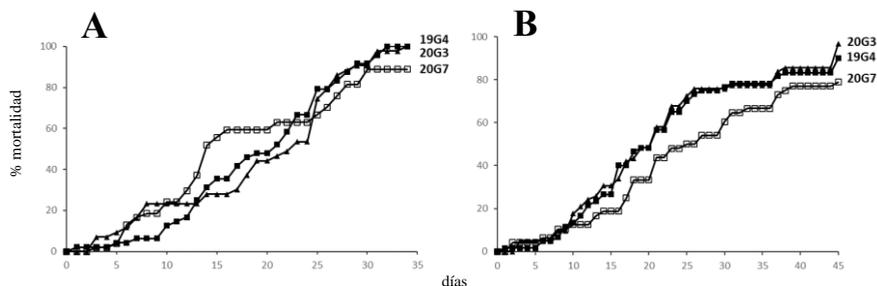


Figura 14. Curvas de mortalidad en los experimentos 7 y 8. A.-Mortalidades acumulativas por las cepas 19G4 (WB/WB), 20G3 (Ab/Ab) y 20G7 (WB/Ab) en salmón de 7 cm infectado por baño con una dosis de 10^5 TCID₅₀/ml. B.- Mortalidades acumulativas por las cepas 19G4, 20G3 y 20G7 en lenguado de 2 g infectado con la dosis 10^5 TCID₅₀/ml.

2.3.5 Infectividad *in vivo* de recombinantes obtenidos por el proceso de coinfección-clonación

En las infecciones llevadas a cabo con las tres cepas de referencia de IPNV, WB, Ab y Sp, junto con las cepas recombinantes obtenidas por coinfección WB/Ab, Ab/Sp y WB/Sp, las tasas de mortalidad fueron en general bajas en ambas especies ensayadas.

El experimento realizado con salmones de 7 cm se hizo en dos fases. En una primera fase, los peces se incubaron a 15 °C durante 10 días, sin producirse mortalidad. Debido a esto, se hizo una segunda infección con la cepa correspondiente a día 20 p.i. y, tras ella, los peces se mantuvieron 20 días más, muestrándose 5 peces por cepa a tiempos 10, 13, 15 días tras la segunda infección, para monitorizar la replicación del virus. En este caso, la cepa Ab fue la única en mostrar una mortalidad elevada, alcanzando un valor de mortalidad acumulativa final del 100%. Las otras cepas en causar bajas fueron WB/Ab, con un 17%, y Sp, con un 12%. El resto de cepas no causaron bajas en salmón (Figura 15A).

En el caso de los lenguados, los niveles de mortalidad fueron muy inferiores (por debajo de 50%). De nuevo, fue la cepa Ab la que provocó mayores valores de mortalidad acumulativa, junto con Ab/Sp (MAC= 27%). Al margen de estas cepas, solo WB/Ab causó bajas, alcanzando valores de MAC finales de 3%. Las otras cepas no causaron mortalidad en el tiempo del experimento (Figura 15B).

Solo algunos individuos inoculados con la cepa Ab y, en menor proporción, inoculados con Sp, mostraron signos de la enfermedad: natación errática, anorexia y pigmentación oscura.

El virus se detectó mediante RT-PCR y fue aislado en cultivo celular de todos los lotes (peces muertos y supervivientes sacrificados al final del experimento).

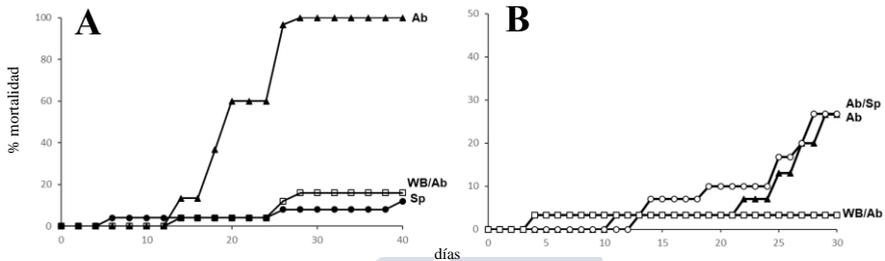


Figura 15. Curvas de mortalidad en peces infectados con las cepas de referencia WB, Ab y Sp y los recombinantes obtenidos por coinfección WB/Ab, Ab/Sp and WB/Sp A.-Mortalidades acumulativas en salmón de 7 cm infectado por baño con una dosis de 10^5 TCID₅₀/ml. B.-Mortalidades acumulativas en lenguado de 2g infectado con la dosis 10^5 TCID₅₀/ml.

2.4 DISCUSIÓN

La recombinación génica (*reassortment*) es un mecanismo que permite, a distintas familias virales, realizar importantes cambios genómicos y fenotípicos mediante la coinfección de distintas cepas en un mismo huésped. Este mecanismo le permite al virus modular su virulencia y adaptarse a distintos huéspedes (Wei y col., 2006; Greenbaum y col., 2012; Pérez-Losada y col., 2015). En virus de peces, este mecanismo ha sido descrito en el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV; Plarre y col., 2012), en betanodavirus (Toffolo y col., 2007; Oliveira y col., 2009), así como en birnavirus acuáticos (Romero-Brey y col., 2009; Moreno y col., 2014). En IBDV, un virus de la misma familia *Birnaviridae*, se ha visto que este proceso tiene una especial importancia a la hora de generar cepas altamente virulentas (Yamaguchi y col., 1997; Hon y col., 2006) y supone un riesgo en la generación de virus quimera a través de la recombinación con cepas atenuadas usadas para la generación de vacunas (Wei y col., 2008; Kasanga y col., 2013).

En IPNV, este mecanismo no había sido estudiado hasta la fecha, por ello, hemos realizado los distintos experimentos *in vitro* e *in vivo* para entender no solo su implicación en la virulencia del virus, sino también para llegar a conocer la dinámica del proceso en este tipo de virus, pudiendo así determinar si es un proceso que se produce al azar o de manera dirigida, como se ha descrito en otras familias de virus (McDonald y col., 2009; Baker y col., 2014; Nomikou y col., 2015). En este estudio hemos observado unos porcentajes de distribución en la progenie significativamente diferentes ($p < 0,0001$) a los esperados en un proceso aleatorio (25% de cada uno de los 4 tipos virales posibles: 2 parentales y 2 recombinantes), por lo que podemos concluir que el proceso no se realiza al azar. Esto nos llevó a indagar aún más sobre los mecanismos que determinan la encapsidación de un tipo de segmento genómico u otro. El hecho de que un tipo viral aparezca con una mayor representación en la progenie puede deberse o bien a que este tipo de segmento se produce en mayor cantidad durante la replicación, o bien a que hay una preferencia en la encapsidación del genoma frente a los otros tipos virales, lo que podría justificarse mediante asociación o unión de distintos tipos de segmentos, o por un mecanismo de encapsidación selectivo. El análisis de las frecuencias de los distintos segmentos en la progenie usando el test χ^2 , y realizado siguiendo el procedimiento de Lubeck y col. (1979), nos permitió demostrar que en algunos casos existe determinada asociación entre ambos segmentos genómicos; en general, hemos observado que existe cierta preferencia entre segmentos homólogos. Sin embargo, la comparación de los experimentos C y D nos ha permitido determinar que el empaquetamiento de segmentos es un fenómeno aleatorio, por lo que la asociación de segmentos no influye en el resultado de la recombinación. Por lo tanto, aunque hemos podido demostrar que el proceso de recombinación o *reassortment* en acuabirnavirus es un proceso no-aleatorio, los mecanismos de replicación y encapsidación siguen siendo desconocidos en este tipo de virus.

Analizando los datos de la bibliografía podemos llegar a distintos escenarios que podrían explicar un proceso dirigido, siempre teniendo en cuenta que en birnavirus la VP1 (polimerasa) puede estar presente en dos formas: como proteína soluble, o bien unida covalentemente al

expremo 5' del genoma, formando una ribonucleoproteína (RNP) (Müller y Nitschke, 1987; Calvert y col., 1991). Además, durante la replicación, VP1 y VP3 interaccionan entre sí, además de interaccionar con los segmentos genómicos (RNP), siendo esta asociación la responsable de la actividad RdRp, lo que implica que la síntesis de RNA depende de la formación de complejos RNP (Tacken y col., 2002; Pedersen y col., 2007; Ferrero y col., 2015). VP3 actúa también como una proteína de andamiaje que interacciona con los trímeros de VP2 para la construcción de la cápside (Lombardo y col., 1999; Maraver y col., 2003; Bahar y col., 2013). Con todo esto, podemos llegar a tres posibles eventos que, durante la replicación, justifiquen un proceso dirigido de recombinación génica:

- a) Transcripción/replicación: Durante la coinfección, la eficiencia de replicación de uno de los genomas es mayor que la de los demás, haciendo que la composición de la progenie no siga un mecanismo aleatorio. Esta eficiencia puede depender de la propia polimerasa o del complejo RNP (Wong y col., 2011). Considerando esta premisa, la distribución de la progenie debería ser independiente del tipo celular utilizado en el proceso de coinfección, sin embargo, salvo en el caso de la coinfección Ab:WB en CHSE-214 y BF-2, la distribución de la progenie en nuestros experimentos sí parece depender del tipo celular utilizado ($p < 0,0001$). Esto concuerda con lo observado en influenza virus, donde otros factores del huésped favorecen la replicación del RNA en las células infectadas (Jorba y col., 2008; Nagata y col., 2016). Por otro lado, si la distribución de los tipos virales en la progenie dependiese exclusivamente de su capacidad de replicación, cabría esperar que estos tipos virales aparecieran en porcentajes más elevados en la progenie, por lo que la eficiencia de la replicación, por sí sola, no nos permite explicar los resultados observados en nuestros experimentos de coinfección.
- b) Traducción: Podrían producirse diferentes afinidades al ribosoma que se justificarían mediante la presencia de sitios de

unión a ribosomas en el RNA, que podrían expresarse a distintos niveles en los distintos tipos de RNA de la progenie. Las estructuras secundarias y terciarias del RNA pueden ejercer un papel crucial en la regulación de la expresión en los ribosomas de la célula. En el caso de IBDV se observó la presencia de un factor de iniciación que interacciona con VP1, ejerciendo un papel regulatorio en la traducción (Tacken y col., 2004), lo que explicaría la variabilidad de expresión de cada RNAm dependiendo de cada tipo celular. Así, segmentos de RNA de distintos tipos virales pueden tener distintos niveles de expresión y producir distintos niveles de proteínas requeridos para construir los complejos RNP. Para algunos virus, como es el caso de IBDV, se ha demostrado que la probabilidad de construir RNP homólogas es mayor que heterólogas (Tacken y col., 2000; McDonald y col., 2009; Hara y col., 2013; Baker y col., 2014) y, en base a nuestros resultados, podríamos asumir que ocurre lo mismo en IPNV. La conclusión de algunos autores de que en birnavirus la VP3 se une al genoma de manera independiente a la secuencia del RNA (Kochan y col., 2003; Pedersen y col., 2007) parece no seguir esta regla, aunque hay que añadir que Kochan y col. (2003) explicaron otros factores que entraban en juego a la hora de conferir especificidad, como puede ser VP1. Por lo tanto, el complejo VP1-VP3-RNA podría ser específico de tipo, lo que sostiene nuestra hipótesis de que durante la traducción se pueden seleccionar distintos tipos virales de la progenie mediante diferentes eficiencias de traducción de cada RNAm en cada sistema celular.

¿Podría esta hipótesis explicar el desplazamiento de algún tipo viral observado en la progenie de alguna de las coinfecciones? Muy difícilmente podría explicar la ausencia de algún tipo viral en la progenie, sobre todo, si tenemos en cuenta que todos los tipos virales de la progenie son replicativos (y en elevados títulos) en cualquiera de las líneas celulares utilizadas, por lo que debemos pensar en algún otro mecanismo de regulación alternativo.

c) Asociación de segmentos, construcción de RNP e inhibición cruzada de RNPs: En algunos tipos virales como reovirus o el virus de la lengua azul de rumiantes (Nibert y col., 1996; Nomikou y col., 2015), la asociación de segmentos genómicos explica por qué unos recombinantes son más frecuentes que otros. En IPNV también parece existir cierta asociación entre segmentos, lo que podría explicar el desplazamiento de un tipo viral de la progenie. Otro mecanismo que puede explicar un mecanismo de *reassortment* dirigido fue descrito por Jarupornpan y col. (2014) en influenza. En este caso, en una coinfección de tipos virales A y B, el tipo B de nucleoproteína (BNP) interacciona con el A (ANP), produciendo una inhibición cruzada que lleva a una disminución en la replicación del tipo A. Gavazzi y col. (2013) revelaron también la existencia de interacciones entre segmentos genómicos de virus influenza que conllevan una regulación preferencial del empaquetamiento genómico. En la misma línea, Gerber y col., (2014) demuestran que la recombinación entre virus poco relacionados filogenéticamente puede ser desfavorable. Nosotros hemos observado resultados similares en este estudio. De hecho, para demostrar si el mecanismo de recombinación se veía favorecido entre virus filogenéticamente más próximos, hicimos una nueva coinfección con la cepa canadiense C1, más relacionada con el tipo americano WB que con los europeos Ab y Sp (Blake y col., 2001). Nuestros resultados demuestran esta hipótesis, ya que las coinfecciones con C1 desplazan los tipos europeos Ab y Sp, apareciendo éstos en frecuencias muy bajas, mientras que en la coinfección C1:WB los resultados parecen ser opuestos, ya que el tipo más frecuente en la progenie es el recombinante entre ambas cepas C1/WB.

¿Podría la interacción entre proteínas heterólogas de IPNV (VP1 tipo 1 y VP3 tipo 2) inhibir la captura o/y replicación de un tipo viral? Esta inhibición justificaría un proceso de recombinación dirigida, sin embargo, aunque es una hipótesis realmente atractiva para justificar

nuestras observaciones, no podemos usarla hasta que se demuestre la existencia de estos mecanismos en birnavirus.

Finalmente, queríamos saber si la recombinación era un mecanismo de adaptación entre especies, motivo por el que realizamos las infecciones experimentales en salmón y lenguado. En este aspecto, cabe destacar que las cepas Sp y WB, que deberían ser altamente virulentas en salmón, mostraron una muy baja mortalidad en ambos experimentos, situación que podría justificarse mediante el elevado número de pases de las cepas utilizadas. Por el contrario, la cepa salvaje 19G4 (WB), aislada en nuestro laboratorio y con un número de pases inferior a 10, resultó ser la más virulenta en ambas especies. Las cepas tipo Ab (cepa de referencia Ab y 20G3) mostraron también elevada virulencia en ambas especies, mientras que las cepas recombinantes mostraron niveles intermedios de virulencia, incluso en la cepa salvaje 20G7. Todos los recombinantes resultaron estar formados por un segmento A de una cepa de baja virulencia y un segmento B de una cepa de alta virulencia (Wei y col., 2006). Algunos autores defienden que la recombinación del segmento B puede ser la razón de la expansión e incremento de virulencia de IBDV. En este aspecto, podemos destacar que las cepas recombinantes obtenidas en este experimento, al igual que los recombinantes naturales con los que hemos trabajado, fueron aisladas de peces asintomáticos, lo que sugiere que la regulación de la virulencia en estas cepas ha podido suponer un mecanismo de persistencia en el huésped.

Los resultados de los ensayos *in vivo* sugieren que, además del *reassortment*, puede haber otro tipo de mecanismos que afecten a la virulencia de acuabirnavirus, como demostraremos en el siguiente capítulo.

En base a nuestros resultados, podemos concluir, por lo tanto, que en acuabirnavirus la recombinación o *reassortment* supone un mecanismo de adaptación a nuevos huéspedes. Además, podemos decir que este proceso no se produce al azar y que parece depender del tipo celular, lo que sugiere un mecanismo de eficiencia selectiva en el reconocimiento entre los diferentes RNAm y los ribosomas celulares, que además, probablemente, pueda depender de la interacción entre segmentos genómicos o inhibición cruzada de RNPs. A pesar de ello,

los mecanismos continúan siendo desconocidos, por lo que futuras investigaciones deben ir enfocadas a la demostración de la existencia de mecanismos de regulación, observados en otras familias virales, también en birnavirus acuáticos.



CAPÍTULO 3: POLIPLOIDÍA

3.1. INTRODUCCIÓN

Como hemos visto en los capítulos anteriores, a pesar de la amplia distribución de los birnavirus acuáticos y su alto impacto en acuicultura, hay pocos estudios sobre los factores que afectan a su virulencia, y los que hay se han centrado, fundamentalmente, en la relación existente entre la secuencia genómica de la región VP2-NS y la virulencia (Bruslind y Reno, 2000; Santi y col., 2004; Shivappa y col., 2004). Otros estudios han analizado, además, otros factores como los distintos tipos de ORF codificantes de VP5 y su relación con la virulencia (Shivappa y col., 2004). Sin embargo, la baja reproducibilidad de los resultados observados a lo largo de nuestros estudios, trabajando con las mismas cepas y el mismo hospedador, o en hospedadores diferentes, nos hicieron sospechar de la existencia de otros factores que podrían no estar teniéndose en consideración. Tras el análisis del efecto sobre la virulencia del *reassortment* o reordenamiento molecular, comprobamos nuevamente que debían existir otros factores todavía inexplorados y que podrían tener un papel adicional en la regulación de la virulencia de birnavirus acuáticos.

En este contexto, el trabajo de Luque y col. (2009), demostrando que el virus de la bursitis infecciosa del pollo (IBDV) es un virus poliploide que puede llegar a empaquetar hasta 4 segmentos de RNA bicatenal (dsRNA), y que esta poliploidía tenía implicación en la virulencia, nos abrió una nueva vía de estudio para entender la complejidad de los sistemas de regulación de virulencia en este tipo de virus. Estos autores, mediante purificación en gradientes de cloruro de cesio de viriones procedentes de cultivos celulares infectados, o de la bursa de Fabricio de aves infectadas, observaron 6 poblaciones de IBDV. Dichas poblaciones tenían la misma composición proteica, pero se diferenciaban en la densidad y el coeficiente de sedimentación,

diferencias que demostraron estar relacionadas con el número de copias de segmentos genómicos empaquetados.

Ciertas observaciones en algunos de nuestros estudios previos concordaban con las de estos autores, ya que, en ocasiones, purificando virus tipo IPNV en gradientes de CsCl, habíamos observado patrones de bandeo con al menos dos bandas, patrón que no podíamos explicar. Además, trabajando con geles de acrilamida se observaban distintos patrones de bandeo de ambos segmentos genómicos, en los cuales, a veces, la densidad de la banda superior parecía ser el doble de la inferior.

Aunque en pocos casos, además de en IBDV (Luque y col., 2009), se ha descrito que virus de otras familias, como los paramixovirus, ortomixovirus o filovirus, desarrollan poliploidía como una herramienta que les permite regular su virulencia (Enami y col., 1991; Rager y col., 2002; Beniac y col., 2012).

Por ello, el objetivo de este estudio era descubrir si los birnavirus acuáticos podrían ser también poliploides y analizar el efecto de la poliploidía sobre la replicación y virulencia del virus, con la esperanza de demostrar que la virulencia de acuabirnavirus es mucho más compleja que la mera intervención de un simple parámetro.

Los datos resultantes de este capítulo fueron publicados en el artículo “Aquabirnavirus polyploidy: a new strategy to modulate virulence?” que se puede consultar en el Anexo de esta tesis.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Líneas celulares y cepas virales

Para la producción, titulación y purificación viral, se usaron monocapas semiconfluentes de BF-2 (tronco caudal de Bluegill, *Lepomis macrochirus*, ATCC-CCL 91). Las células se cultivaron a 20 °C en medio esencial de Eagle (EMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

Para este estudio, se emplearon las cepas de referencia Ab y WB, así como la cepa recombinante 5B1_E (segmento A tipo WB y segmento B tipo Ab) aislada de bacalao salvaje (*Gadus morhua*) en el banco pesquero Flemish Cap (Romero-Brey y col., 2009). Las inoculaciones

se realizaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 virus/célula, y las células infectadas se mantuvieron a 15 °C hasta la visualización de ECP.

3.2.2 Titulación viral

Para la titulación viral, mediante el método de TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50), se emplearon placas de 96 pocillos con monocapas semiconfluentes de BF-2. Para ello, se realizaron diluciones seriadas del virus en tampón de Earle's suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, y se inoculó cada dilución por triplicado. Las células se incubaron a 15 °C durante 10 días, tras los cuales se calculó el título viral por el método de Reed y Muench (1938).

3.2.3 Purificación viral

Para cada purificación, se inocularon una media de 20-25 frascos de 150 cm² de BF-2. Una vez observado el efecto citopático, la suspensión viral se centrifugó a 3000 g durante 10 min y el sobrenadante se incubó, durante 24 h a 4 °C, con polietilenglicol 8000 al 5 % y 0,5 M de NaCl, en agitación. Tras la incubación, el virus se centrifugó a 8000 g durante 30 min y el precipitado se resuspendió en tampón PES (25 mM piperazina-N, N-bis [2-ácido etanosulfónico] pH 6,2, 150 mM NaCl, y 20 mM CaCl₂) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), y se volvió a precipitar a través de un lecho de sacarosa al 25% en tampón PES, a 35000 rpm en un rotor SW55Ti (Beckman Coulter), durante 1 h a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 500 µl de tampón PES y se cargó en un gradiente de CsCl (1,33 g/ml) que se centrifugó a 31000 rpm durante 20 h, a 4 °C, en un rotor SW32Ti (Bekman Coulter).

Tras la purificación, las distintas bandas, que se visualizaron mediante un haz de luz fría desde el fondo del tubo, a través de su eje longitudinal, se recuperaron mediante punción con jeringuilla y se dializaron en tampón PES durante 24 horas a 4 °C, en continua agitación, tras lo cual, los viriones purificados se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

La nomenclatura usada para las bandas fue de F1 a F6, desde la parte superior a la inferior del tubo (de menor a mayor densidad).

3.2.4 Análisis del contenido genómico de las fracciones F3-F6

El contenido genómico de las fracciones se analizó mediante separación de ambos segmentos genómicos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Previamente a la electroforesis, se igualaron las fracciones F3 a F6 en base a su contenido proteico, usando el kit comercial BCA (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando la proteína seroalbúmina como patrón. Una alícuota de cada fracción se sometió a digestión con proteinasa K a una concentración de 2 mg/ml, en presencia de 0,5% de SDS, durante 12 h a 37 °C. A continuación, las muestras se desnaturalizaron a 98 °C durante 5 min y se cargaron, con tampón de carga 4× (250 mM TRIS HCl, pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 20% β-mercaptoetanol, 0,004% azul bromofenol en H₂O Milli-Q), en geles de acrilamida al 7,5% y se sometieron a electroforesis a 150V durante 4 h (Laemmli, 1970). Las bandas se visualizaron usando dos tinciones diferentes: tinción con Red Safe (iNtRON Biotechnology), un análogo del bromuro de etidio, y tinción con nitrato de plata, usando el kit comercial Silver Stain Plus™ kit (BIO-RAD), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis y normalización de los geles para la cuantificación de las bandas se hizo usando el software Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) e Image J software (NIH). Así, las proporciones entre el contenido genómico de las distintas fracciones se calcularon mediante normalización usando la fracción F3 como referencia, por ser esta, previsiblemente, la de menor número de segmentos genómicos, además de ser la primera fracción en estar compuesta únicamente por partículas virales T=13 y no por subpartículas virales (SVPs).

3.2.5 Análisis del contenido proteico de las fracciones F1-F6

Para el análisis del contenido proteico, una alícuota de cada fracción se desnaturalizó a 98 °C durante 3 min; inmediatamente después, se mezcló con el tampón de carga 2 × (2,5 ml Tris HCl pH 6,8; 4 ml SDS 10%; 2 ml glicerol; 1ml β-mercaptoetanol; 0,1 ml rojo fenol 0,5%; 1,4 ml H₂O Milli-Q) y se sometió a electroforesis en gel vertical de poliacrilamida al 12 %, durante 90 min a 150 V. Las bandas se

visualizaron mediante tinción con azul Coomasie coloidal (EZBlue™ Gel Staining Reagent, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante, y con azul coomasie al 2,5 g/l en solución de metanol-ácético (45% metanol, 45% H₂O, 10% ácido acético), usando para el desteñido una solución de 25% etanol, 25% ácido acético y 50% H₂O; para ello, los geles se incubaron una hora en la solución de teñido y a continuación se aplicaron consecutivos lavados hasta alcanzar el nivel tinción deseado.

En paralelo, otros geles se sometieron a electrotransferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), en una célula de electrotransferencia, con tampón de transferencia (192 mM glicina, 20% v/v metanol, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3), a 100 V, durante 1h a 4 °C. A continuación, se aplicó Western Blot; brevemente: tras bloqueo mediante incubación durante 30 min en leche en polvo al 5% en PBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal, obtenido en conejo en nuestro laboratorio, frente a la cepa Sp) diluído 1/500 en solución de bloqueo, durante 1h. Tras 3 lavados en PBS, las membranas se incubaron durante 1h con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Goat anti-rabbit IgG-Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich) diluído 1/2000 en solución de bloqueo, y se volvió a lavar del mismo modo. Para el revelado, se usó el método de quimioluminiscencia ECL (Amersham ECL Western Blotting detection reagents and analysis system, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.6 Microscopía electrónica

Para la visualización, bajo microscopía electrónica, de las partículas virales de las fracciones, una alícuota de 2 µl de cada fracción se cargó en una rejilla de cobre con membrana de carbono, cargada negativamente mediante descarga iónica con el sistema Spulter Coater Quorum 150 TS. Tras una incubación de 2-3 min, se secó el exceso de muestra mediante el contacto del borde de la rejilla con un papel de filtro y posteriormente se lavó dos veces con agua, repitiendo la operación de secado. Por último, se tiñó con acetato de uranilo al 2% en agua y, tras una incubación de 2-3 min, se retiró el exceso de líquido y se dejó secar.

Las rejillas se visualizaron en microscopios JEOL JEM-2010 y ZEISS Libra 200 FE OMEGA del servicio de microscopía electrónica de la USC, operando a 120 kV.

3.2.7 Infección experimental

Para evaluar el efecto de la poliploidía sobre la virulencia, se llevaron a cabo dos infecciones experimentales, la primera con 200 alevines de salmón (*Salmo salar*) de 7 cm y la segunda con 150 lenguados de 2 g (*Solea senegalensis*), en ambos casos procedentes de piscifactorías sometidas por nuestro laboratorio a controles periódicos.

Los peces se sometieron a un período de aclimatación de 7 días a 15 °C, distribuidos en tanques a una densidad máxima de 100 peces por 100 l de agua, y suministrándole una dieta comercial. En ese período de tiempo se testaron, mediante RT-PCR y nested-PCR, para descartar la presencia de los virus IPNV, VNNV (virus de la necrosis nerviosa viral) y VHSV (virus de la septicemia hemorrágica viral), y también se aplicó una siembra bacteriológica para descartar presencia de patógenos bacterianos. Tras este período, y habiendo confirmado que los peces estaban libres de patógenos, los especímenes se inocularon vía inyección intraperitoneal con 100 µl del inóculo viral correspondiente a cada fracción (igualadas a una dosis de 10^5 TCID₅₀/ml); un grupo control se inyectó con medio L-15. Tras la infección, los peces se distribuyeron en lotes de 40 individuos, en el caso de los salmones, y de 30, en el caso de los lenguados; los lotes inoculados se nombraron con el nombre de la fracción con la que fueron inoculados y se mantuvieron a 15 °C durante 40 días, en el caso de los salmones, y 30, en el caso de los lenguados; en todo este período, se llevó a cabo un seguimiento diario para detectar signos de la enfermedad y recoger los peces muertos, que se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

En el caso de los salmones, y debido a la ausencia de mortalidad (a día 20 p.i.), se llevó a cabo una segunda ronda de infección con la fracción correspondiente, continuando con muestreos (de 5 peces por fracción/día) a días 30, 33 y 35 p.i (10, 13, 15 tras la segunda infección).

Al final del experimento, los peces supervivientes y los peces control se sacrificaron con una sobredosis del anestésico etil 3-aminobenzoato metanosulfonato (MS-222, Sigma).

Toda la fase experimental se llevó a cabo siguiendo la directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos, realizando todos los esfuerzos para reducir el sufrimiento animal, y siguiendo un protocolo aprobado por el Comité Gallego de Bioética de la Xunta de Galicia (Licencia ID 15004/13/002).

3.2.8 Detección viral a partir de muestras de tejido

Para confirmar la presencia del virus en los peces inoculados, se muestrearon los lotes de riñón, hígado y bazo de 5 individuos, extraídos en condiciones asépticas. Para el procesado de las muestras de tejidos, se siguió el protocolo establecido por Ledo y col. (1987). Tras la homogenización con rodillo, los órganos se resuspendieron en tampón Earle's suplementado con antibióticos (1000 UI/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomina, 500 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de anfotericina D); el ratio de resuspensión fue 1/10 p/v en aquellas muestras que pesaron menos de 1,5 g y 1:1 p/v en las de mayor peso. A continuación, se volvió a triturar el contenido de la bolsa para obtener una mezcla homogénea. La suspensión se centrifugó a baja velocidad (7500 g) durante 15 min a 4 °C para precipitar los restos de tejido. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se incubó a 4 °C durante 16 h, para permitir la actuación de los antibióticos y eliminar la posible contaminación bacteriana y/o fúngica. Transcurrido ese tiempo, se separó una alícuota de cada muestra para su análisis virológico y el resto se conservó a -20 °C.

Para el aislamiento en cultivo celular, los homogenados clarificados se diluyeron 1/10 y 1/100 en tampón de Earle suplementado con antibióticos, y se inocularon 100 µl de cada dilución, por triplicado, en placas de 48 pocillos. Como control positivo, se inoculó una cepa de referencia de IPNV, y como control negativo se mantuvieron tres pocillos sin inocular. La incubación se realizó a 15 °C durante 15 días, visualizando diariamente en busca de aparición de efecto citopático. Tras la destrucción del tapiz celular, se recogió el contenido del pocillo (virus crudo) y se realizó un segundo y tercer pase (de ser necesario).

Se consideraron positivas aquellas muestras con dos pases consecutivos con ECP. Por último, una alícuota del último pase de cada muestra se recogió y se analizó mediante RT-PCR y nested-PCR.

Para el análisis por PCR, una alícuota de los homogenados clarificados y del virus crudo de los pases por cultivo celular se sometió a extracción de RNA, usando el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el RNA final en 50 µl de H₂O libre de RNasas. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) en un volumen final de reacción de 20 µl: 9 µl de RNA, 1 µl de Random Primers (en un primer paso) y 4 µl de tampón 5X, 1 µl de DTT, 1 µl de dNTPs, 0,2 µl de transcriptasa inversa SSIII y 3,8 µl de agua libre de RNasas (en un segundo paso). El RNA y los cebadores se incubaron durante 5 min a 95 °C para favorecer la desnaturalización de RNA y cebadores, pasando inmediatamente a 4 °C. A continuación, se añadió a los tubos la mezcla elaborada en el paso 2 y se prosiguió con el programa: un ciclo consistente en rehibridación a 25 °C, durante 5 min y 1 ciclo de extensión de 50 min, a 50 °C y finalizando con una elongación a 85 °C durante 5 min. La PCR se llevó a cabo con el kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega). Para ello, se preparó una mezcla de reacción con 4 µl de cDNA, 10 µl de tampón de PCR 5X Green GoTaq®, 5 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTP, 0,5 µl de cada cebador, 0,25 µl de Go Taq Flexi DNA polimerasa y H₂O libre de RNasas hasta 50 µl. Las mezclas de reacción se sometieron a una desnaturalización inicial de 95 °C durante 4 min y a 30 ciclos de amplificación, cada uno consistente en una fase de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, rehibridación a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Por último, se aplicó una extensión final a 72 °C, 10 min. Los cebadores usados para la PCR fueron, 5'AGAGATCACTGACTTCACAAGTGAC 3' (forward) y 5' CTCAGTAGAAAGGACACCACGTGT 3' (reverse), descritos por Heppell y col. (1992). La nested-PCR se llevó cabo del mismo modo que la PCR, usando el mismo kit comercial, pero partiendo de 4 µl del producto de PCR y usando la pareja de cebadores 5'AAAGGCATGGGGCTGGAGAG 3'(forward) y 5' TGTGCACCACAGGAAAGATGACTC 3' (reverse), en posiciones

1439 y 1754, respectivamente, en base a la secuencia genómica de la cepa Jasper (M18049).

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 2% y se visualizaron mediante la tinción con Red Safe (iNtRON Biotechnology).

Para la PCR en tiempo real (qPCR) aplicada sobre el segmento B, se empleó el método de SYBR Green, usando los cebadores 5' CHGCCGGCCTACCNTACATAGG 3' (forward) y 5' CCRCAGCTBAGRTACCAGAAGTCGG 3' (reverse) en posiciones 838 and 976 en la cepa Jasper (M58756), y el kit GoTaq® PCR Master Mix (Promega), siguiendo las intrucciones del fabricante.

3.2.9 Purificación viral a partir de tejido de peces infectados

Con el ánimo de demostrar si la poliploidía estaba presente también en condiciones naturales, se hicieron llegar al laboratorio alevines de trucha común (*Salmo trutta*) procedentes de una piscifactoría con un brote de infección por IPNV y se procedió a la purificación de virus a partir de los tejidos infectados. Para ello, y debido al tamaño de los especímenes, se recogió la cavidad peritoneal con todos los órganos; los tejidos se homogenizaron en tampón de Earle's en proporción 1:1 peso/volumen, con ayuda de un blender (lotes de aproximadamente 1-1,5 kg de tejido). El tejido homogenizado se sometió a 3 pulsos de sonicación de 60 s, para favorecer la liberación del virus de los tejidos. Tras ello, la suspensión se centrifugó a 8000 g en frascos de 1 l, durante 40 min y el sobrenadante se recogió e incubó con antibióticos (1000 UI/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomicina, 500 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de anfotericina) durante 4 h a 4 °C. Tras la incubación, se añadió polietilenglicol (PEG) 8000 al 5 % y 0,5 M de NaCl y se incubó en agitación a 4 °C durante toda la noche. A continuación, se precipitó el virus capturado por el PEG mediante centrifugación en frascos de 250 ml a 8000 g durante 45 min. El precipitado de cada frasco se resuspendió en 10 ml de tampón PES y se mezcló con un volumen de freón, se agitó durante 5 min y se centrifugó de nuevo, 30 min a 8000 g. La fase acuosa se recogió y se precipitó mediante ultracentrifugación en tampón PES a 25000 rpm, en rotor

SW41Ti. El precipitado se resuspendió en 500 μ l por tubo y se cargó en un lecho de sacarosa al 25% en tampón PES, centrifugando a 35000 rpm en un rotor SW55Ti (Beckman Coulter), durante 1h a 4 °C. El precipitado se volvió a resuspender en 500 μ l de tampón PES y finalmente se cargó en un gradiente de CsCl (1,33 g/ml), centrifugando a 31000 rpm durante 20 h, a 4 °C, en un rotor SW32Ti de Bekman Coulter. Tras la purificación, las bandas (de 1 a 3) se visualizaron mediante un haz de luz fría desde el fondo del tubo, se recuperaron mediante punción con jeringuilla y se dializaron en tampón PES durante 24 horas a 4 °C, en continua agitación. Los viriones purificados se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

Debido al poco éxito de recuperación de virus tras la purificación de virus IPNV a partir de tejido, las únicas pruebas que se llevaron a cabo en estas fracciones fueron el análisis por microscopía electrónica, análisis del contenido proteico y titulación por TCID₅₀/ml. Además, se realizó extracción de RNA y RT-PCR a partir de muestras tomadas en las distintas fases de la purificación, para determinar en qué pasos se podría estar perdiendo virus.

3.3. RESULTADOS

Los resultados que se presentan a continuación son los observados en las purificaciones de la cepa recombinante 5B1_E, por ser la cepa con un mayor número de repeticiones (más de 30), pero los resultados observados fueron los mismos para las tres cepas ensayadas (incluyendo las dos cepas de referencia Ab y WB).

3.3.1 Composición de las fracciones virales en CsCl

La purificación de virus tipo IPNV en gradientes de CsCl llevó a la visualización de hasta seis bandas (fracciones F1 a F6), localizadas a las densidades $1,280\pm 0,021$, $1,300\pm 0,044$, $1,306\pm 0,004$, $1,310\pm 0,05$, $1,314\pm 0,006$ y $1,323\pm 0,007$ g/ml, siendo la fracción F6 la que contiene mayor cantidad de virus purificado (más del 50%).

El número de bandas observadas en las distintas purificaciones varía de 2 a 6, lo que parece estar relacionado con la concentración de virus purificado (Figura 16). En las purificaciones con un menor número de bandas, las que se visualizan solo son las 3 últimas (F4-F6),

que son las de mayor concentración de virus y, por lo tanto, de mayor intensidad (Figura 16d-e). Las fracciones 1 y 2 son las de menor proporción de virus, aunque en ocasiones F1 aparece más concentrada que las demás, casi igualando a F6 (Figura 16c).

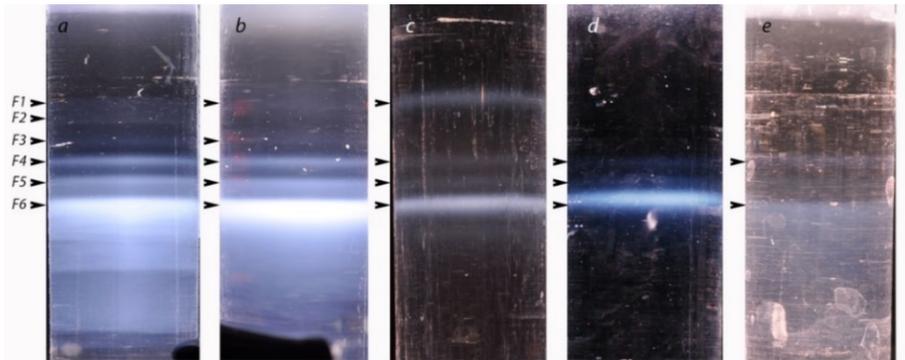


Figura 16. Fracciones virales visualizadas tras ultracentrifugación en gradientes de CsCl. Se visualizan entre 2 y 6 fracciones, denominadas de F1 a F6, de menor a mayor densidad. Las densidades a las que se encuentra cada banda son, de F1 a F6: $1,280 \pm 0,021$, $1,300 \pm 0,044$, $1,306 \pm 0,004$, $1,310 \pm 0,05$, $1,314 \pm 0,006$ y $1,323 \pm 0,007$, respectivamente.

Las imágenes de microscopía electrónica para estas fracciones revelaron que las primeras dos fracciones (F1 y F2) están formadas principalmente por partículas de aproximadamente 25 nm, que se corresponden con las estructuras T=1 conocidas como SVP y compuestas únicamente por la proteína VP2. Además, en estas fracciones también se observan, aunque en menor proporción, partículas de 50 nm (T=7) y partículas T=13 vacías, rotas y completas (que aparecen en mayor concentración en F2; Figura 17). Las fracciones F3 a F6 están compuestas por viriones íntegros de distinto tamaño, observándose así partículas T=13 entre 55 y 90 nm (como se mostrará en el apartado 3.3.4).

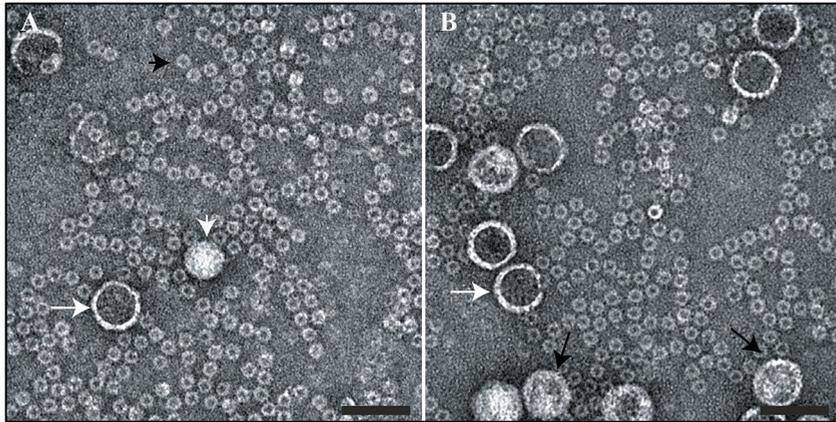


Figura 17. Imágenes de microscopía electrónica de las fracciones F1 y F2. Imágenes de microscopía electrónica de las fracciones F1 (A) y F2 (B), teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2%. Estas fracciones se componen principalmente de SVP (subviral particles; puntas de flecha negras) y, en menor proporción, de partículas de 50 nm (puntas de flecha blancas) y partículas T=13, vacías, rotas (flechas blancas) y en menor cantidad, completas (flechas negras). Barra de escala de 100 nm.

Debido a las diferencias de composición observadas de las fracciones F1 y F2 con respecto a las demás, estas dos fracciones se excluyeron del posterior análisis, ya que no podían ser igualadas con las otras en cuanto a su contenido proteico.

3.3.2 Análisis del contenido proteico de las fracciones F1-F6

Los geles de SDS-PAGE de proteínas virales, revelados mediante azul coomasie, coomasie coloidal y Western Blot, mostraron que las fracciones F3 a F6 tienen la misma composición proteica: VP1 (94 kDa), VP2 (54 kDa), VP3 (31 kDa) y VP4 (24 kDa), aunque se apreciaron algunas diferencias según el método de revelado, ya que VP4 no se detectó mediante Western Blot, solo mediante coomasie (Figura 18). VP1 no se detectó en la fracción F1, y apenas se visualizó mediante Western Blot en F2, lo que indica su baja concentración en esta fracción. Lo mismo ocurre con VP3, que solo se visualizó en F1 y de forma muy débil, mediante Western Blot. VP4 no se visualiza por ninguno de los métodos en las primeras dos fracciones. Sin embargo,

es importante remarcar que la cantidad de VP2 observada en F1 y F2 fue prácticamente la misma que en F6, a pesar de la baja cantidad de viriones en las primeras.

Estos resultados se muestran en la Figura 18. Es importante destacar que, aunque la figura corresponde a los resultados obtenidos con la cepa 5B1_E, los mismos patrones se observaron con las cepas de referencia Ab y WB.

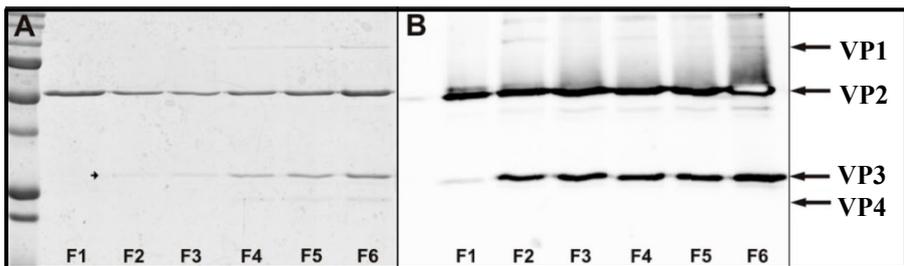


Figura 18. Composición proteica de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación de la cepa 5B1_E. A. Perfil proteico obtenido por electroforesis SDS-PAGE y tinción con coomasie coloidal. B. Perfil proteico obtenido por SDS-PAGE y Western Blot.

3.3.3 Análisis de la composición genómica de las fracciones F1-F6

El análisis del contenido genómico se llevó a cabo con las fracciones F3-F6 igualadas en base a su contenido proteico; se descartaron las fracciones F1 y F2, debido, en primer lugar, a su bajo contenido en virus completo, y a que su diferente composición no permitía igualarlas con las demás. El cálculo de proporciones entre las distintas bandas observadas en los geles se llevó a cabo usando la fracción F3 como referencia en términos de contenido proteico, asumiendo que, al igual que en IBDV (Luque y col., 2009), las partículas virales de F3 contendrían un único equivalente genómico.

Como se puede observar en la Figura 19, los geles obtenidos por electroforesis SDS-PAGE y teñidos con nitrato de plata revelaron un incremento gradual de la cantidad de genoma incorporada de las fracciones F3 a F6. Normalizando la densidad de las bandas con respecto a F3, los resultados (de más de 15 réplicas) indicaron que la

cantidad de genoma de las fracciones F4, F5 y F6 era $1,58\pm 0,13$, $2,18\pm 0,13$, y $3,04\pm 0,33$ veces mayor que en F3, respectivamente.

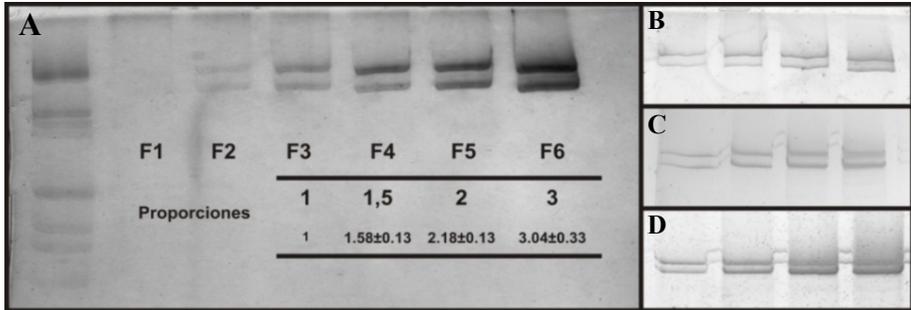


Figura 19. Patrones de RNA obtenidos por electroforesis SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata. A.- Gel en el que se muestran las bandas correspondientes a ambos segmentos genómicos de las fracciones F1 a F6 (cepa 5B1_E) y el patrón de proporciones entre las fracciones F3-F6 con respecto a la fracción F3: $1,58\pm 0,13$, $2,18\pm 0,13$ y $3,04\pm 0,33$ para las fracciones F4 a F6, respectivamente. B.- Réplica en la cepa 5B1_E. C.- Patrón observado en la cepa Ab. D.-Patrón observado en la cepa WB

Estos datos sugieren, por lo tanto, que el número de equivalentes genómicos por fracción sería 1, 1,5, 2 y 3 (de F3 a F6), lo que demuestra que los birnavirus acuáticos son capaces de encapsidar hasta 3 copias de dsRNA (2 segmentos genómicos en F3, 3 en F4, 4 en F5 y 6 en F6). El incremento de los distintos segmentos genómicos no es equimolar, ya que en la fracción 4 se incorpora únicamente una copia del segmento A, poseyendo esta fracción dos copias del segmento A y una del segmento B.

3.3.4 Tamaño de las partículas de las fracciones F3-F6

Las imágenes de microscopía electrónica de las distintas fracciones obtenidas a partir de más de 30 réplicas de purificación, a partir de las 3 cepas ensayadas (5B1_E, Ab, WB), revelaron que las fracciones F3 a F6 estaban constituidas por partículas completas T=13 con un rango de tamaños muy variable, intra- e inter- fracción (Tabla 15).

Tabla 15. Tamaño (nm) de las partículas virales detectadas en cada fracción.

TAMAÑO	FRACCIÓN			
	F3	F4	F5	F6
Mínimo	55	55	65	65
Máximo	80	80	90	80
Rangos ¹	55, 65-70, 70-75, 75, 80	55, 70, 70- 75, 75-80	65-70, 70, 70-75, 75, 80, 90	65-70, 70, 70- 75, 80
Media ²	70,66±1,68	75,67±0,9	75,99±1,43	75,86±0,93

¹-Rango de tamaños observado ²- Tamaño media ± desviación estándar

En la fracción F3 se visualizaron partículas de entre 55 y 80 nm, encontrándose la mayoría (alrededor del 85%) de las partículas en el rango 65-75 nm (media del tamaño 70,66±1,68 nm). Las partículas de 55 nm, minoritarias en esta fracción, también se observaron en F4, en muy baja proporción (0,9%). En esta fracción, el rango de tamaños varía también hasta 80 nm (aunque este tamaño fue muy minoritario), siendo el tamaño más frecuente el de 75nm (75,67±0,9). Las fracciones F5 y F6 carecen de partículas de 55 nm y su rango de tamaños oscila entre 65 y 80 nm para F6, y entre 65 nm y 90 nm en F5, fracción en la que se observaron los mayores tamaños de partícula (88-95 nm), (Figura 20). La media del tamaño de partículas mayoritarias en estas fracciones fue de 75,99±1,43 en F5 y 75,86±0,93 en F6.

A pesar de que no hay un rango bien definido entre las distintas fracciones, se observa que la media de los tamaños de las partículas es ligeramente mayor en aquellas fracciones que incorporan más de un equivalente genómico, siendo las fracciones con un mayor número de segmentos en las que se observa un aumento del porcentaje de partículas dentro de los mayores tamaños observados. Así, en la fracción F3, la mayoría de las partículas (un 85%) se encuentra en un rango de tamaño de 65-75 nm; en F4 un 92 % se encuentra en el rango 70-75 nm; en F5 el 86% de las partículas miden entre 70-85 nm y, por último, en F6 el 96% de los virus se encuentran en el rango 70-80 nm.

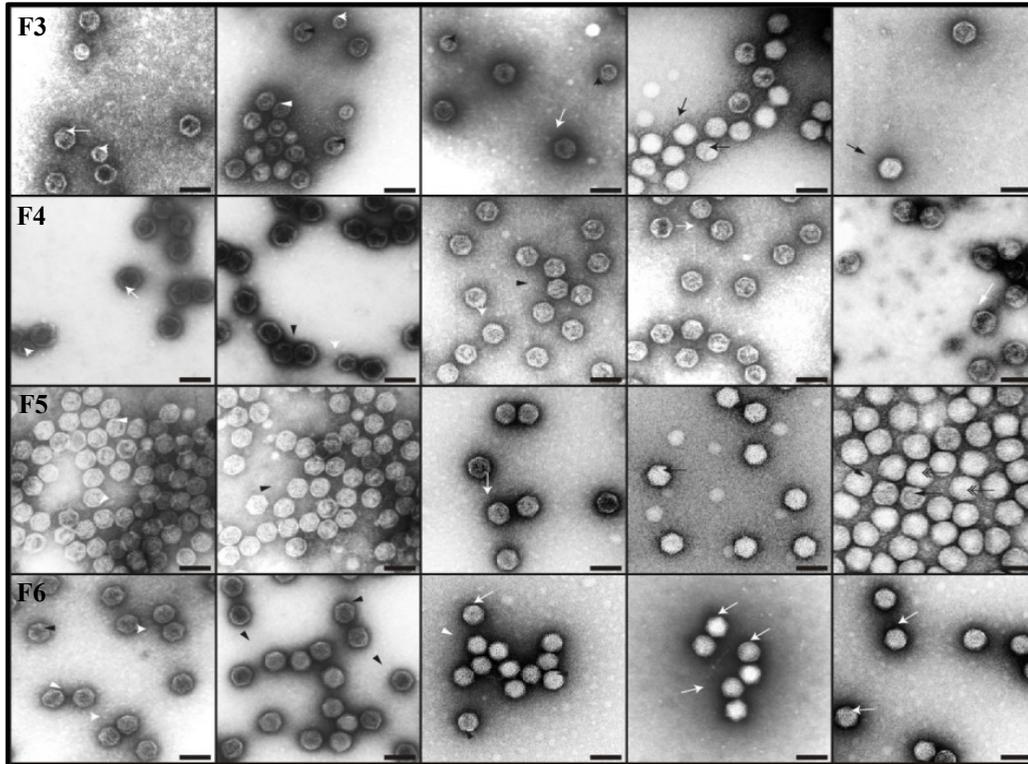


Figura 20. Imagen de microscopía electrónica de las poblaciones F3 a F6. La escala equivale a 100nm. Las flechas de punta curvada en color blanco, indican un tamaño de alrededor de 55 nm y en negro en torno a 65 nm. Las flechas con punta triangular de color blanco se corresponden con tamaños de 65-70 nm, y en negro de 70 nm. Flechas largas con punta curvada en blanco indican tamaños entre 70 y 75 nm y en negro en torno a 75 nm. Con punta triangular largas en color blanco indican tamaños de entre 75 y 80 nm, y en negro de aproximadamente 80 nm. Por último, las negras de doble punta tamaños próximos a 90 nm.

3.3.5 Replicación *in vitro*

Las fracciones F3 a F6, igualadas en función de su contenido proteico, se titularon directamente, sin pase previo por cultivo celular. Todas ellas desarrollaron el efecto citopático característico de este tipo de virus en la línea celular BF-2. Como se refleja en la Tabla 16, el título observado en las distintas fracciones se incrementó al mismo tiempo que el número de equivalentes genómicos.

Tabla 16. Títulos de las fracciones obtenidas tras la purificación de virus tipo IPNV

Fracción	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Nº equivalentes	-	-	1	1,5	2	3
Título (TCID ₅₀ /ml)	3,16×10 ⁵	9,7×10 ⁶	6,3×10 ⁷	8,9×10 ⁸	3,2×10 ⁹	1×10 ¹⁰
Logaritmo	5,55	6,7±0,7	7,8± 0,51	8,95± 0,37	9,5± 0,18	10± 0,88

Al haber igualado las fracciones F3-F6 por su contenido proteico, se asume que a la hora de titularlas todas contienen el mismo número inicial de partículas virales, por lo que los distintos títulos observados ($6,3 \times 10^7$ TCID₅₀/ml con F3, $8,9 \times 10^8$ TCID₅₀/ml con F4, $3,2 \times 10^9$ con F5 y 1×10^{10} con F6) se deben a la diferente capacidad replicativa de las partículas que constituyen cada fracción.

Las fracciones F1 y F2, pese a ser excluidas del resto de los análisis por no poder ser igualadas por su contenido proteico, también se titularon y alcanzaron valores de alrededor de 10^5 y 10^6 TCID₅₀/ml, respectivamente, lo que confirma la presencia de partículas virales completas, como se observó bajo microscopía electrónica.

3.3.6 Virulencia *in vivo*

Las inoculaciones experimentales realizadas en lenguado y salmón se llevaron a cabo con las 3 cepas empleadas en este estudio, habiendo aplicado 2 repeticiones solo en el caso de la cepa recombinante 5B1E. Son precisamente los resultados de esta cepa los que se muestran en este capítulo, aunque fueron similares con las cepas de referencia Ab y WB.

Las tasas de mortalidad en los experimentos de infección fueron en general bajas, especialmente en lenguados y en las fracciones F4 y F5 (Figura 21).

En lenguados las mortalidades acumulativas (MAc) de las cuatro fracciones ensayadas no rebasaron el 25 %. Las mortalidades se iniciaron al mismo tiempo (4 días p.i.) en todas las fracciones excepto F4, siendo la fracción F6 la que alcanzó mayores niveles de mortalidad acumulativa (MAc de 20%). Las fracciones F3 y F5 dieron valores de MAc de 7% y 3% respectivamente, mientras que la fracción F4 no causó ninguna baja durante los 30 días del experimento (Figura 21A). Los peces no mostraron los típicos síntomas de la enfermedad IPN durante todo el experimento; los únicos signos de la enfermedad observados fueron anorexia y natación errática en algunos lenguados infectados con la fracción F6.

A pesar de la baja mortalidad, el virus se aisló en cultivo celular y se detectó en todos los lotes tanto por RT-PCR, como por qPCR.

En el caso de los salmones, debido a la ausencia de mortalidad en los 20 primeros días tras la infección, se llevó a cabo una segunda inoculación con la fracción correspondiente. Por lo tanto, los datos que se reflejan en la Figura 21B, se corresponden con las mortalidades acumulativas en el segundo período de infección (días 20 a 40 del comienzo del experimento).

En este caso, las mortalidades también se iniciaron poco después de la infección con todas las fracciones, excepto F4, en la cual se inicia a día 14. De nuevo, son las fracciones F4 y F5, las que presentan menores tasas de mortalidad, alcanzando valores de MAc finales de 17% y 4% respectivamente. F6 y F3, al igual que en lenguados, son las que provocaron un mayor número de bajas, alcanzando el 100% de los peces no muestreados con F6 a día 15 p.i. y el 57% con F3.

Solo algunos individuos inoculados con las fracciones F3 y F6, presentaron signos claros de la infección, como pigmentación oscura, exoftalmia y natación errática.

El virus se aisló en cultivo celular y se detectó por RT-PCR y qPCR en todos los lotes.

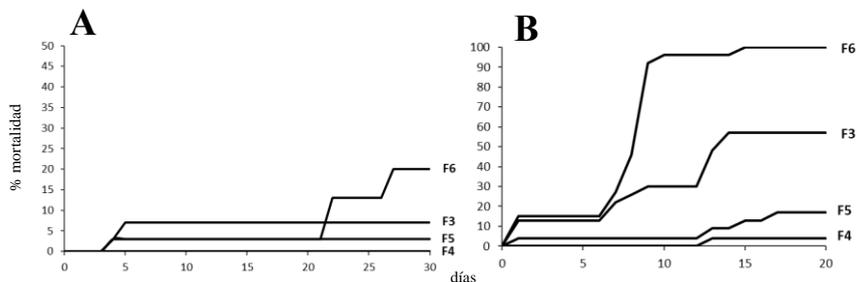


Figura 21. Curvas de mortalidad de las fracciones F3-F6 en las dos especies de peces ensayadas. Se representa en el eje X el tiempo post-infección, en días, y en el eje Y la mortalidad acumulativa en porcentaje (MAC). **(A)** Curvas de mortalidad acumulativa (MAC) en lenguado (*Solea Senegalensis*). **(B)** Curvas de MAC en salmón (*Salmo salar*).

3.3.7 Análisis de las fracciones obtenidas por purificación de virus a partir de tejido

Tras repetidas purificaciones a partir del tejido de truchas infectadas con virus tipo IPNV, se logró la separación de 1 a 3 bandas muy tenues (fracciones T1 a T3, de menor a mayor densidad), no habiendo logrado la penetración en el gradiente de la mayoría de las partículas virales.

Al analizar el contenido de las bandas por microscopía electrónica, se comprobó que las fracciones estaban compuestas principalmente por partículas virales rotas y restos celulares. También se observaron partículas completas, aunque en muy baja concentración (Figura 22).

Los títulos virales de las tres fracciones recuperadas en una purificación fueron de 10^2 TCID₅₀/ml para T1 y T2 y de 10^3 TCID₅₀/ml, con T3, lo que confirma que contienen partículas completas y funcionales, encontrándose la mayor concentración de virus en la parte superior del gradiente, sin penetrar (10^5 TCID₅₀/ml).

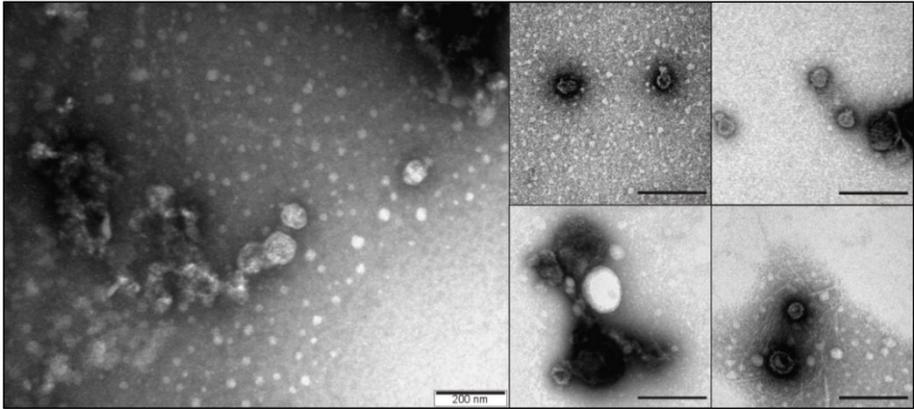
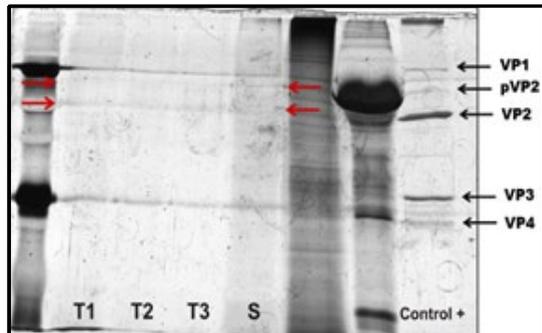


Figura 22. Imágenes de microscopía electrónica de las fracciones recuperadas tras la purificación de virus tipo IPNV, a partir de tejidos de trucha infectada. En estas fracciones se observó una gran cantidad de restos celulares y partículas virales rotas. En menor proporción también se observaron partículas completas. Escala: 200 nm.

En los gels de proteínas de las tres fracciones recuperadas tras la purificación a partir de los tejidos de truchas infectadas, no aparece el patrón de bandeo característico de este tipo de virus, tan solo se observan dos bandas tenues que podrían representar las proteínas pVP2 y VP2 (Figura 23).

Figura 23. Gel de proteínas de las tres fracciones virales recuperadas tras purificación a partir de tejido de trucha infectada con IPNV. T1, T2 y T3: fracciones recuperadas, de menor a mayor densidad; S: fracción superior de virus que no penetra en el gradiente. Las flechas indican las bandas que pueden representar las proteínas pVP2 y VP2.



Los análisis mediante RT-PCR de las muestras tomadas en los distintos pasos del proceso de purificación (fracción acuosa tras la centrifugación

con freón, precipitado y sobrenadante tras el precipitado de la fase acuosa del freón, precipitado del lecho de sacarosa y fracción purificada) revelaron la presencia de virus en todos los pasos, además de la pérdida de una gran cantidad de partículas en el proceso de purificación, como se comprobó por la intensidad de las bandas obtenidas por RT-PCR (Figura 24).

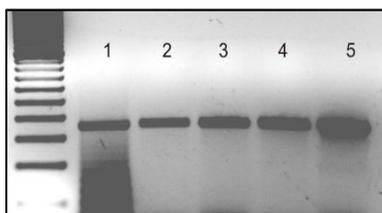


Figura 24. Productos de PCR de las distintas alícuotas recogidas durante la purificación. 1. Precipitado tras la centrifugación del PEG (que se mezcla con freón). 2. Sobrenadante de la centrifugación del PEG (que se descarta) 3. Fase acuosa recuperada en la centrifugación con freón. 4. Sobrenadante de la posterior centrifugación (se descarta), previo a la carga en el lecho de sacarosa. 5. Virus purificado

3.4. DISCUSIÓN

En capítulos anteriores, hemos analizado factores moleculares que podrían estar implicados en la modulación de la virulencia de virus IPNV, incluyendo regiones y dominios específicos de la secuencia genómica defendidos por otros autores (Sano y col., 1992; Bruslind y Reno, 2000; Santi y col., 2004; Shivappa y col., 2004; Song y col., 2005), así como la propiedad de *reassortment* o reordenamiento molecular, defendida por nuestro grupo como un factor más de virulencia de este virus. Sin embargo, los resultados, en ocasiones poco reproducibles, nos hicieron sospechar que debía existir algún otro mecanismo viral modulador del nivel de virulencia. En este capítulo, se ha estudiado un nuevo factor que podría regular la virulencia de birnavirus acuáticos junto con residuos aminoacídicos específicos y el reordenamiento molecular. Este factor, la poliploidía, presente en muy pocas familias virales, ya se había demostrado con antelación en el género *Avibirnavirus* de la misma familia, *Birnaviridae*, que el IPNV y que, al igual que otras familias virales, utiliza este recurso para modular su virulencia (Enami y col., 1991; Rager y col., 2002; Luque y col., 2009; Beniac y col., 2012). Para analizar si esta característica estaba también presente en el género *Aquabirnavirus*, llevamos a cabo una

búsqueda de fracciones virales de distinta densidad mediante la aplicación una serie de purificaciones en gradientes de CsCl, analizando las 2 a 6 poblaciones (fracciones) resultantes.

En nuestro estudio, el mayor o menor número de bandas visualizadas en los gradientes de CsCl estaba relacionado con la cantidad inicial de virus: los patrones de 5 y 6 bandas solo se observaron cuando se partía de un *stock* mayor de virus para someter a purificación. Entre estas 6 fracciones, solo F1 y F2 mostraron el patrón proteico de las SVPs (subpartículas virales) descritas por Coulibaly y col. (2010), que resultaron ser los componentes mayoritarios de dichas fracciones. El patrón proteico esperado para virus IPNV se observó en el resto de fracciones, compuestas por partículas icosaédricas T=13 completas. Por esta razón, fueron estas cuatro fracciones, F3-F6, las seleccionadas para el análisis estequiométrico de la composición genómica.

Los resultados del análisis del contenido genómico de las fracciones F3 a F6, igualadas en cuanto a su contenido proteico, demostraron claramente que el número de segmentos genómicos encapsidados aumentaba de las fracciones de menor a mayor densidad. Así, relativizando el contenido genómico con respecto a la fracción F3 (la de menor contenido), y asumiendo que los virus de esta fracción incorporarían una copia de cada uno de los segmentos (un equivalente genómico), el número de equivalentes genómicos para las demás fracciones analizadas sería 1,5, 2 y 3, de F4 a F6, respectivamente; así, los viriones F4 tendrían dos copias del segmento A y una única del B, mientras que las partículas F5 tendrían dos copias de ambos segmentos, y las F6 tres. Estos resultados demostraron que la poliploidía también está presente en el género *Aquabirnavirus*, pudiendo encapsidar hasta tres copias de su propio genoma.

En el estudio previo de Luque y col. (2009), se demostró que los viriones de IBDV pueden empaquetar hasta 4 copias de dsRNA, lo que corresponde con 2 equivalentes genómicos, y que todas las fracciones incorporan una cantidad equimolar de cada uno de los segmentos. En el caso de esos autores, la fracción tomada como referencia fue F2, ya que esta estaba formada por partículas virales completas; en cambio, en nuestro estudio la composición de esta fracción (formada principalmente por SVPs) hizo que tuviésemos que descartarla del

análisis y que la fracción de referencia fuese F3. Aún asumiendo que la fracción F2 tuviese una mínima cantidad de partículas $T=13$, tomando esta como referencia y asumiendo que las fracciones F3-F6 incorporaran un número creciente de equivalentes genómicos, los resultados observados diferirían de los observados en IBDV. No obstante, lo realmente trascendental es la demostración de que la poliploidía es un fenómeno que también está presente en IPNV.

La poliploidía puede conllevar un problema en la encapsidación del genoma durante la morfogénesis, ya que cabe esperar que el aumento del contenido genómico implique un incremento en el tamaño de la partícula. Este es un fenómeno muy conocido en células eucariotas, donde se ha observado que un incremento de $2\times$ en el contenido genómico implica un aumento de 1,6 veces del tamaño nuclear (Comai, 2005). Este hecho no representa un problema en virus con nucleocápsides helicoidales, ya que estas son más permisivas a las variaciones en la cantidad del genoma. Los filovirus constituyen un ejemplo claro de este hecho, ya que la partícula modifica su longitud, manteniendo su diámetro constante, permitiendo encapsidar hasta 22 copias genómicas (Beniac y col., 2012); sin embargo, este hecho no siempre está relacionado con el incremento de la virulencia, ya que se ha visto que en ocasiones los niveles más altos de virulencia están asociados a los filamentos más cortos (Kiley y col., 1982).

Tal incremento del volumen de la cápside tiene más limitaciones en virus icosaédricos, ya que contienen un volumen de carga bien definido. De hecho, en el caso de IBDV, que puede encapsidar hasta 4 copias de dsRNA, las partículas virales mantienen un diámetro constante (Luque y col., 2009); este hecho es posible gracias a que el volumen de la partícula es muy superior al necesario para empaquetar una única copia del genoma, lo que, a su vez, permite la movilización del dsRNA durante la replicación (Castón y col., 1997).

En nuestro estudio, los viriones de IPNV fueron capaces de encapsidar hasta 3 copias del genoma; sin embargo, a diferencia de IBDV, las partículas de IPNV incrementan su tamaño al incorporar más de un equivalente. En la bibliografía se han descrito tamaños variables, de 55 a 74 nm, para la cápside de IPNV, siendo su tamaño más frecuente 60 nm (Lightner y Post, 1969; Moss y Gravell, 1969; Kelly y Loh, 1972;

Chang y col., 1978). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que las partículas de birnavirus acuáticos oscilan entre 60 y 85 nm (observándose incluso partículas de más de 90 nm en F5). Las partículas de 60-65 nm se observan, en porcentajes variables, en la mayoría de las fracciones, observándose incluso, en algunas ocasiones, partículas de inferior tamaño (55 nm), aunque solo en las fracciones F3 y F4. Los tamaños más frecuentes son 70 nm en F3, y en torno a 75 nm en las demás fracciones. Además, se observa un número creciente de partículas de en torno a 80 nm de F3 a F6 y algunas partículas de alrededor de 90 nm en F5. Considerado la media de los tamaños más frecuentes entre las partículas de cada fracción, los volúmenes de las partículas serían 2,720, 2,783, 2,787 y 2,785 nm³, respectivamente. Por lo tanto, aunque es evidente que existe una necesidad real del incremento del volumen de la cápside para introducir más segmentos genómicos, no parece existir una relación directa entre el incremento de equivalentes genómicos y el tamaño de las partículas. Con los datos disponibles en la actualidad, y debido al desconocimiento de la arquitectura de las partículas purificadas, no podemos explicar la amplia variedad de tamaños observados en las distintas purificaciones, e incluso, dentro de cada fracción de una misma purificación, pero los resultados obtenidos representan un hecho demostrado, puesto que están basados en multitud de mediciones en diferentes experimentos.

Los resultados de replicación *in vitro* mostraron que todas las fracciones eran funcionales y capaces de replicar en células BF-2. Además, se ha observado que el incremento en el número de equivalentes conlleva un incremento de la infectividad de la partícula, siendo las partículas con un mayor contenido genómico las que alcanzan los mayores títulos, hecho que ya había sido demostrado en IBDV (Luque y col., 2009). Las fracciones F1 y F2, pese a ser descartadas para el análisis estequiométrico debido a su diferencia en la composición y contenido proteico, mostraron cierta infectividad residual, indicando que contienen partículas virales completas, aunque debe ser en muy baja concentración, ya que en los geles de estas fracciones no se ha observado un patrón de proteínas completo.

Los ensayos de infectividad *in vivo* se realizaron con dos especies de peces con las que ya habíamos trabajado previamente de modo extenso; por ello, esperábamos resultados predecibles. A este respecto, sin embargo, las mortalidades observadas usando alevines de lenguado fueron inferiores a las esperadas. En el caso de los ensayos llevados a cabo con salmón, se usaron juveniles en vez de alevines, con el ánimo de reducir la virulencia esperada del virus, como se ha demostrado con las bajas tasas de mortalidad y morbilidad observadas en los 20 días post-inoculación. De hecho, solo se produjo mortalidad tras la segunda infección con la fracción correspondiente. A pesar de las bajas tasas de mortalidad observadas en ambas especies, el virus se detectó y aisló en cultivo celular a partir de todos los lotes. Basándonos en los resultados del experimento en cultivo celular, esperábamos observar una clara relación entre la infectividad de cada fracción y el número de equivalentes genómicos encapsidados por el virión *in vivo*. Desafortunadamente, solo la fracción F6 (con 3 equivalentes genómicos) mostró una elevada virulencia en ambas especies; las otras fracciones mostraron niveles intermedios de mortalidad acumulativa, siendo especialmente bajos en F4 y F5. Basándonos en estos resultados, no podemos sugerir una relación clara entre el número de equivalentes genómicos y la virulencia, como cabría esperar tras los análisis de replicación *in vitro*. A este respecto, deberían realizarse nuevos experimentos de infectividad *in vivo* que aclarasen el efecto de este fenómeno sobre la virulencia.

A pesar de que este análisis se trató de hacer también a partir de tejido de trucha infectada con virus tipo IPNV, el proceso de purificación mostró un bajo rendimiento y no permitió recuperar fracciones aptas para el análisis. La concentración de virus recuperado fue muy baja, ya que, como comprobamos, una gran parte del virus se pierde en las distintas fases de la purificación, y las partículas virales observadas en microscopía electrónica estaban muy deterioradas, por lo que no pudieron realizarse los análisis estequiométricos correspondientes. Esto puede deberse a la complejidad del proceso y a la dificultad para eliminar los lípidos de la muestra. Consideramos que este es un apartado pendiente para futuros estudios, ya que el conocimiento de la existencia *in vivo* (como confiamos que sea, al igual

que en IBDV) puede ser de gran interés para la comprensión de los mecanismos de virulencia de este tipo de virus.

En conclusión, podemos decir que todas nuestras observaciones demuestran que la poliploidía está también presente en el género *Aquabirnavirus*, pudiendo ser una característica general en la familia *Birnaviridae*, y que el hecho de empaquetar un número creciente de segmentos genómicos está directamente relacionado con un incremento del tamaño de la partícula viral, así como con el incremento de la capacidad replicativa *in vitro* y probablemente con un incremento en la virulencia, lo que debe ser ratificado en futuros estudios.



DISCUSIÓN

Según el último informe SOFIA sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura emitido por la FAO (2018), la acuicultura sigue creciendo a mayor ritmo que otros sectores importantes de la producción de alimentos. La contribución de la acuicultura a la producción mundial de productos de la pesca de captura y la acuicultura en su conjunto, ha venido aumentando de forma constante en los últimos años hasta llegar a representar en 2018 cerca del 50% del total de producción de pescado a nivel mundial; el dato se eleva al 73,7% si hablamos de China, el principal país productor, que produce al año más toneladas de pescado que todo el resto del mundo. Teniendo en cuenta el incremento de la producción acuícola en los últimos 30 años y la disminución de la pesca de captura, es probable que el crecimiento futuro del sector pesquero derive principalmente de la acuicultura, garantizando esta el abastecimiento de pescado para consumo humano. De hecho, la producción, habiéndose estancado en Europa y Oceanía en los últimos años, sigue una marcha ascendente en el resto de continentes, y en 2016 ya eran 37 países los que tenían una mayor producción de peces cultivados que de capturas de la pesca.

El consumo de pescado se ha duplicado desde la década de 1960 y es probable que la demanda siga creciendo. El Decenio de las Naciones Unidas de Acción sobre la Nutrición 2016-2025, dirigido por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), pretende sensibilizar al público acerca de la función del pescado y garantizar su incorporación general en las políticas de seguridad alimentaria y nutrición. Con ello, se espera una demanda aún mayor de cara al futuro, lo que conlleva la necesidad de una mejor gestión de los problemas que limitan el desarrollo de la acuicultura, entre los que se encuentra la introducción y la propagación de enfermedades de los animales acuáticos, su predicción, tratamiento y prevención.

Los obstáculos en el tratamiento de las enfermedades en acuicultura son, entre otros: las limitaciones en las técnicas de diagnóstico, la existencia de patógenos crípticos y organismos que pueden volverse patógenos cuando se los presenta a nuevos hospedadores y nuevos entornos, limitaciones en opciones de control para enfermedades de animales acuáticos, la aparición de síndromes de enfermedades multifactoriales e infecciones subclínicas frecuentes, el estado no domesticado de la mayoría de las especies acuáticas cultivadas y la escasez de información sobre la situación sanitaria de los animales acuáticos. Por ello, la clave de la gestión de la salud de los animales acuáticos sigue siendo examinar exhaustivamente las interacciones entre el receptor, el agente patógeno y el medio ambiente, así como entender el mecanismo molecular por el cual los microorganismos son capaces de modular su virulencia entre distintos hospedadores, y que a su vez, permitirán elaborar vacunas más eficaces, instrumentos de diagnóstico más rápidos y sensibles, y estrategias de bioseguridad que utilicen poblaciones exentas de patógenos específicos.

De entre las enfermedades infecciosas más relevantes en la acuicultura, son las virales las que despiertan un mayor interés en la actualidad. Al margen de las consideradas de declaración obligatoria [anemia infecciosa del salmón (ISAV), herpesvirus Koi, necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) y necrosis hematopoyética epizootica, septicemia hemorrágica viral (VHS), enfermedad de la cabeza amarilla (YHDV) y el síndrome de Taura (que afecta a camarones)], se producen muchas otras infecciones causadas por virus difíciles de controlar y erradicar; entre ellas, se encuentra el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), que sigue produciendo grandes pérdidas económicas en el sector debido a la elevada tasa de mortalidad en alevines de salmónidos.

Esta tesis se diseñó con el fin de profundizar en el conocimiento sobre la organización molecular de este tipo de virus y arrojar algo de luz para el desarrollo de nuevos tratamientos y vacunas. El trabajo se estructuró en tres etapas. En primer lugar, el estudio a partir de varios aislados de epizootias y reservorios, de los determinantes de virulencia en la secuencia genómica descritos previamente por otros autores. A

continuación, el análisis del mecanismo de *reassortment* o recombinación intermolecular entre segmentos genómicos de cepas coinfectantes, hecho descrito previamente en IPNV por nuestro grupo (Romero-Brey y col., 2009), y análisis de su efecto sobre la virulencia. Por último, la demostración de la existencia de poliploidía en virus tipo IPNV, propiedad demostrada recientemente por Luque y col. (2009) en el virus IBDV (perteneciente a la misma familia) y su implicación en la virulencia.

En el primer capítulo se han analizado los distintos tipos de la proteína VP5 descritos en la literatura, así como residuos específicos de las regiones VP2-NS y VP1 relacionadas con la virulencia, en una batería de cepas que incluyen las cepas de referencia WB, Ab, Sp, N1, tres aislados obtenidos de peces salvajes en el banco pesquero Flemish Cap (19G4, 20G3 y 20G7), dos aislados de peces procedentes de piscifactorías gallegas (1146 y 2290) y otros dos procedentes de reservorios próximos a esas piscifactorías (24R y 88R). En cuanto a la implicación de VP5 en los niveles de virulencia de IPNV, tanto *in vitro* como *in vivo*, hay muchas discrepancias. Ciertos autores afirman que VP5 es dispensable para la replicación, virulencia y persistencia del virus (Weber y col., 2001; Santi y col., 2005b), pero más recientemente, Méndez y col. (2015) demostraron que era fundamental para la dispersión del virus IBDV, quedando en duda si ocurriría lo mismo en IPNV. En nuestro estudio se han observado tres tipos de VP5: la VP5 típica de 148 aa, y dos formas truncadas de 133 y 15 aa. La mayoría de las cepas incluidas en el análisis pueden expresar dos de ellas: las cepas WB, 19G4 y 20G7 (serotipo WB) presentan las formas de 148 y 15 aa; las cepas Sp, 1146 (serotipo Sp), Ab, 20G3, 2290 y 24R (serotipo Ab) presentan las VP5 de 148 y 133 aa, y solo las cepas N1 y 88R (serotipo Sp) presentan una única forma de VP5 de 148 aa. A pesar de esto, no se observó ninguna relación directa entre la expresión de una forma determinada de VP5 y la capacidad de adsorción o de replicación del virus, ya que en los resultados de replicación diferencial se observaron niveles de adsorción altos y bajos para cada patrón de VP5, siendo los niveles de replicación similares en todas las cepas. Por otro lado, tampoco encontramos evidencias de relación entre los tipos de ORF observados en cada cepa y su origen.

Si hablamos de los residuos de la región VP2-NS implicados en virulencia, nos encontramos la misma situación de controversia en la literatura. A pesar de que se ha determinado que los principales residuos aminoacídicos del segmento A relacionados con la virulencia son los de las posiciones 217, 221, 247 (Bruslind y Reno, 2000; Santi y col., 2004; Shivappa y col., 2004) y que la presencia de Thr en posiciones 217 y 247 está asociado con un alto nivel de virulencia, mientras que en 221 se relaciona con cepas avirulentas, otros autores han observado que no siempre se cumplen (Salgado-Miranda y col., 2014; Ruane y col., 2014). Nuestros resultados parecen no seguir tampoco las pautas de virulencia propuestas para estos tres residuos, ya que, a pesar de que poseen Thr en la posición 221, y no presentan Thr en la posición 217, lo que podría relacionarse con una baja virulencia, todas ellas, con excepción de Ab, muestran altos niveles de adsorción y replicación en la línea celular BF-2. Otra observación importante podría ser que la presencia de una Pro en posición 217 implica una mayor eficiencia en la adsorción a la célula, ya que las cepas con este aminoácido en 217 mostraron los porcentajes de adsorción más altos, por encima del 90%. Sin embargo, no hemos encontrado ninguna relación entre la variación de secuencia en estas posiciones y su capacidad replicativa.

Hemos analizado también otras dos posiciones, 496 y 500, descritas por Santi y col. (2004) como potencialmente implicadas en virulencia. Con respecto a estas posiciones, la única observación resaltable sería que la combinación observada en el aislado 20G3, Arg⁴⁹⁶ Leu⁵⁰⁰, podría relacionarse con una replicación más lenta, ya que esta cepa tarda 3 días en iniciar el desarrollo de ECP, siendo éste, además, de evolución más lenta (8 días para completar el ECP).

En VP2 hemos observado, además, ciertas diferencias de las cepas aisladas del Flemish Cap con respecto a sus cepas de referencia correspondientes: un cambio de Gly (G) a Ala (A) en posición 217 de la cepa WB respecto a 19G4 y 20G7, y un cambio de A⁴⁹⁶ Y⁵⁰⁰ de la cepa Ab a R⁴⁹⁶ L⁵⁰⁰ en la cepa 20G3, que podrían justificar las diferencias en los valores de adsorción y cinética de replicación en estas cepas (sobre todo, para justificar la replicación lenta observada en 20G3).

Aparte de las posiciones descritas por otros autores, hemos encontrado otras posiciones altamente variables 243, 249, 250 y 473, que tampoco parecen estar relacionadas con la virulencia de las cepas ensayadas, ya que no justifican las diferencias de adsorción y replicación observadas, aunque podrían estar relacionadas con el serotipo de la cepa.

En cuanto a la influencia de la polimerasa viral en la eficiencia de replicación y la virulencia, ya demostrada en IBDV (Liu y Vakharia, 2004; Boot y col., 2005; Wei y col., 2006), nos hemos encontrado con una escasa bibliografía que la demuestre en IPNV. Solo Shivappa y col. (2004) asociaron ciertos residuos de VP1 con la virulencia (125, 154, 187, 240 y 690), estando este hecho aún sin demostrar. Nuestro grupo ya ha sugerido en el pasado la implicación del segmento B en la virulencia, tras varias infecciones experimentales con cepas recombinantes y parentales aisladas en el banco pesquero Flemish Cap, en las que se observaron patrones de virulencia que podrían relacionarse con la secuencia del segmento B (Lago y col., 2010); pero, hasta el momento, no se habían analizado los residuos relacionados con la virulencia en estas cepas. Analizando dichos residuos, solo se observaron diferencias en los aa del residuo 690, donde la presencia de Glu/Ala (no en todos los casos) podría conllevar una disminución de la capacidad de adsorción de las partículas y cierta desventaja replicativa, observándose en este caso, inferiores títulos al inicio del ECP y en el momento de lisis total del tapiz celular. Hemos observado, también en esta región, una serie de residuos altamente variables en estas cepas, en posiciones 85, 176 y 658 que, al igual que los residuos variables observados en la región VP2-NS, parecen estar relacionados con la determinación del serotipo-genotipo de la cepa.

La escasez de resultados concluyentes sobre la implicación de estos residuos en la virulencia de birnavirus acuáticos nos ha impulsado a estudiar otros factores ya conocidos, como es el caso del *reassortment* y su posible repercusión en la virulencia, ya que cada vez parece estar más claro que la regulación de la virulencia de este virus es el resultado de la conjunción de distintos factores. En cuanto a la presencia de este fenómeno en IPNV, ya había sido demostrada por nuestro grupo en el año 2009 (Romero-Brey y col., 2009) siendo aún desconocidos, antes

del presente estudio, los mecanismos que dirigen dicho proceso en este tipo de virus y su implicación en la virulencia; temas que hemos abordado en el segundo capítulo de esta tesis.

Este fenómeno es ampliamente conocido en distintas familias virales (Yamaguchi y col., 1997; Hon y col., 2006; Wei y col., 2006; 2008; Toffolo y col., 2007; Olveira y col., 2009; Greenbaum y col., 2012; Plarre y col., 2012; Kasanga y col., 2013; Pérez-Losada y col., 2014), donde se ha observado que permite la adaptación a nuevos hospedadores y la modulación de la virulencia. Nuestro estudio es el primero realizado en virus tipo IPNV, y el objetivo no es únicamente determinar la dinámica del proceso sino también analizar su repercusión, *in vitro* e *in vivo*, sobre la infectividad y virulencia de las cepas. Nuestros resultados *in vitro*, demuestran que el *reassortment* es un fenómeno que se produce en porcentajes variables, de 10 a 28%, que parecen depender del hospedador. También se observa una gran diferencia en el nivel de reasorción (*reassortment*) asociado al número de pases que ha sufrido la línea celular empleada, siendo casi inexistente en el clon de BF2 envejecido. Si hablamos del método de secuenciación, es el sistema Illumina el que proporciona mejores resultados, por ser más sensible y permitir identificar tipos virales minoritarios en la progenie, que pasarían desapercibidos con el método tradicional de clonación-secuenciación Sanger.

Los análisis estadísticos llevados a cabo con los porcentajes de distribución de los distintos tipos virales en la progenie arrojan algo de luz sobre cómo se produce este tipo de recombinación en birnavirus acuáticos, pero no podemos demostrar cual es el mecanismo que dirige la recombinación de los segmentos genómicos en este tipo de virus. Estos porcentajes permiten concluir que el *reassortment* es un proceso no-aleatorio, ya que determinados tipos virales aparecen con mayor representación en la progenie viral e incluso en ocasiones algún tipo se ve desplazado en la progenie. Si esto se debe a que unos segmentos se producen en mayor cantidad durante la replicación o a la posible interacción entre distintos tipos de segmentos para dirigir la encapsidación, no queda del todo claro en este estudio. Los análisis estadísticos llevados a cabo a este respecto (Lubeck y col., 1979), demuestran que en algunos casos sí se observa cierta asociación entre

segmentos homólogos, lo que podría justificar este fenómeno no-aleatorio; sin embargo, en dos de los experimentos (C y D), el empaquetamiento de segmentos parece realizarse al azar, por lo que esa no parece ser la única justificación.

Para poder explicar este hecho, hemos recurrido una vez más a la bibliografía y nos hemos planteado 3 hipótesis diferentes. En primer lugar, valoramos la posibilidad de que esta regulación se lleve a cabo durante la fase de transcripción del RNA, de tal modo que durante la fase de síntesis, la eficiencia de replicación de los genomas de los distintos tipos virales sea diferente. Esto podría deberse al complejo de ribonucleoproteína (RNP) o a la propia polimerasa del mismo (Wong y col., 2011). Pero, si esto ocurriese, la distribución de la progenie debería ser independiente del tipo celular utilizado en el proceso de coinfección; sin embargo, en nuestros experimentos sí que aparecen diferencias significativas entre los dos tipos celulares ensayados. Además, cabría esperar que estos tipos virales aparecieran en porcentajes más elevados en la progenie, por lo que la eficiencia de la replicación, por sí sola, no nos permite explicar los resultados observados en nuestros experimentos de coinfección. La segunda de las hipótesis sería la posibilidad de que el nivel de traducción proteica difiriera entre las distintas cepas, lo que podría justificarse con una diferente afinidad al ribosoma, como ya se demostró en otros virus (Tacken y col., 2004). En nuestro caso, esta diferencia de afinidad podría deberse a la interacción del RNA con las proteínas virales VP1 y VP3, aunque esta hipótesis no nos permite justificar la ausencia de algún tipo viral en la progenie, ya que todos se mostraron replicativos a elevados títulos en las líneas celulares ensayadas. La última de las hipótesis se basa en la posibilidad de que la asociación de segmentos y la formación de RNP produzca una inhibición cruzada entre distintas RNPs de la progenie, lo que sí explicaría que unos tipos de recombinantes sean más frecuentes que otros, y explicaría también la ausencia de algunos de ellos en la progenie (Nibert y col., 1996; Nomikou y col., 2015). Este hecho quedó reflejado en las coinfecciones con la cepa canadiense C1, más relacionada con el tipo americano WB, que con los europeos Ab y Sp, ya que la cepa C1 desplaza los tipos europeos en la progenie, apareciendo estos en frecuencias muy bajas, mientras que en la

coinfeción C1:WB los resultados parecen ser opuestos, ya que el tipo más frecuente en la progenie es el recombinante entre ambas cepas C1/WB, demostrándose así que el mecanismo de recombinación se veía favorecido entre virus filogenéticamente más próximos.

Nuestras observaciones podrían indicar que la interacción entre proteínas heterólogas de IPNV (VP1 tipo 1 y VP3 tipo 2) puede inhibir la captura o/y replicación de un tipo viral, lo que justificaría un proceso de recombinación intermolecular no-aleatoria; pero, a día de hoy este mecanismo de interacción aún no ha sido descrito en birnavirus, lo cual lo convierte en una hipótesis interesante, aunque no demostrada hasta el momento.

Tras el descubrimiento del *reassortment* en birnavirus acuáticos (Romero-Brey y col., 2009), nuestro estudio ha permitido entender en cierta medida, cómo se produce este fenómeno *in vitro*, no pudiendo definir del todo los mecanismos que lo regulan. En cuanto a su implicación en la infectividad y virulencia, tampoco hemos obtenido resultados determinantes. Las cepas recombinantes, tanto salvajes como obtenidas por clonación en el laboratorio, mostraron niveles intermedios de virulencia en ambas especies estudiadas (salmón y lenguado), alcanzándose los mayores niveles de mortalidad acumulativa en las cepas de origen salvaje, siendo también estas las que causaron claros signos de la infección en los peces. Además, todos los recombinantes resultaron estar formados por un segmento A de una cepa de baja virulencia y un segmento B de una cepa de alta virulencia, lo que, teniendo en cuenta que estas cepas fueron aisladas de peces asintomáticos, parece indicar que la regulación de la virulencia en estas cepas ha podido suponer un mecanismo de persistencia en el huésped.

Son precisamente los resultados *in vivo* los que nos hacen pensar que, al igual que lo que ocurría con los determinantes de la secuencia genómica en las regiones VP2-NS y VP1, el *reassortment*, por sí solo, no permite explicar la regulación de la virulencia en birnavirus acuáticos. Esto señala directamente a que deben entrar en juego otros factores.

Es por ello que, en el tercer capítulo de la tesis hemos abordado el estudio de la poliploidía en birnavirus acuáticos, fenómeno ya demostrado en otro miembro de la misma familia, IBDV (Luque y col.,

2009), y que creíamos que podía estar también presente en IPNV y representa un componente más en el mecanismo regulador de la virulencia de este tipo de virus.

Son pocos los virus que presentan esta cualidad de poliploidía; las pocas familias virales que la poseen, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Ortomyxoviridae* poseen cápsides helicoidales o pleomórficas, que permiten albergar mayores volúmenes y, por lo tanto, múltiples copias de su genoma. Con el estudio de Luque y col. (2009) se demostró la existencia de este fenómeno también en virus icosaédricos. En dicho estudio, se encontraron 6 poblaciones de IBDV mediante purificación en gradientes de cloruro de cesio de viriones procedentes de cultivos celulares infectados, o de la bursa de Fabricio de pájaros infectados. Dichas poblaciones tenían la misma composición proteica, pero se diferenciaban en la densidad y el coeficiente de sedimentación, diferencias que demostraron estar relacionadas con el número de copias de dsRNA empaquetadas. En este caso, tomando la fracción F2 como referencia, por ser la primera formada por partículas virales completas, observaron que IBDV es capaz de incorporar hasta 4 copias de dsRNA, lo que corresponde con 2 equivalentes genómicos, y que todas las fracciones incorporan una cantidad equimolar de cada uno de los segmentos.

En nuestro análisis demostramos que la poliploidía está también presente en el género *Aquabirnavirus* (al menos *ex vivo*), pudiendo ser una característica de la familia *Birnaviridae*. Las múltiples purificaciones en gradientes de CsCl llevadas a cabo con las cepas de referencia Ab y WB, así como la cepa 5B1E (aislada de bacalao salvaje en el banco pesquero Flemish Cap), con la que se aplicó un mayor número de repeticiones, nos han llevado a la visualización de un número variable de bandas, de 3 a 6, en función de la concentración original de virus, obteniéndose en la mayoría de los casos 6 poblaciones que denominamos fracciones F1-F6. A pesar de observar el mismo patrón de bandeo que en IBDV, son muchas las diferencias detectadas en IPNV en los distintos análisis. En primer lugar, en el caso de nuestras cepas, los análisis de microscopía electrónica y de composición proteica revelaron que las fracciones F1 y F2 estaban formadas principalmente por SVPs, acompañadas de cápsides vacías y,

en menor concentración, viriones completos (observados en mayor cantidad en F2). La primera fracción compuesta únicamente por partículas virales completas fue F3, por lo que fueron las fracciones F3-F6 con las que se llevó a cabo el correspondiente análisis de la composición genómica (igualando la cantidad proteica de las fracciones con respecto a F3).

Los resultados del análisis del contenido genómico de las fracciones F3 a F6, igualadas en cuanto a su contenido proteico, demuestran que el número de segmentos genómicos encapsidados aumenta de las fracciones de menor a mayor densidad. El número de equivalentes genómicos para las fracciones analizadas sería de 1 en F3, 1,5 en F4, 2 en F5 y 3 en F6, demostrando así que IPNV puede encapsidar hasta tres copias de su contenido genómico. Otra diferencia es que, en este caso, el incremento de los segmentos genómicos no se hace de manera equimolar, como ocurría en IBDV.

Pero, quizá, una de las observaciones más relevantes, y otra de las principales diferencias con respecto a los resultados obtenidos en IBDV, fue que en nuestras repeticiones hemos encontrado un amplio rango de tamaño de partículas para las distintas fracciones purificadas, lo que parece demostrar que en el caso de virus tipo IPNV, el aumento del contenido genómico implica un incremento en el tamaño de la partícula viral. Este es un hecho no observado hasta el momento en otras familias virales, ya que otros virus poliploides como filovirus, ortomyxovirus y paramyxovirus poseen cápsides helicoidales o pleomórficas que son más permisivas en el incremento de la cantidad del genoma. En el caso de IBDV, las partículas virales encapsidan hasta dos copias del genoma, manteniendo su diámetro constante, gracias a que el volumen de la partícula es mucho mayor al necesario para empaquetar una única copia del genoma, lo que a su vez permite la movilización del dsRNA durante la replicación (Castón y col., 1997). Pero, en nuestro caso, los viriones de IPNV incrementan su tamaño al incorporar más de un equivalente. Las partículas de las fracciones purificadas en nuestros experimentos oscilan entre 55 y 85 nm (observándose incluso partículas de más de 90 nm en F5), siendo los tamaños más frecuentes 70 nm en F3 y en torno a 75 nm en las demás fracciones, y observándose un número creciente de partículas de

alrededor de 80 nm de F3 a F6. Por lo tanto, parece existir una relación directa entre el incremento de equivalentes genómicos y el tamaño de las partículas, indicando la necesidad de un incremento del volumen de la cápside, que en este caso pasaría a ser, de F3 a F6: 2,720, 2,783, 2,787 y 2,785 nm³, respectivamente. La amplia variedad de tamaños observados en las distintas purificaciones, incluso dentro de cada fracción, nos ha permitido demostrar el cambio de tamaño de partícula con el incremento del contenido genómico, sin embargo, muy a nuestro pesar, el desconocimiento de la arquitectura de estas partículas purificadas hace que no podamos explicar estas observaciones.

Para determinar el efecto de la poliploidía sobre la virulencia, hemos llevado a cabo experimentos *ex vivo* e *in vivo* con las distintas fracciones purificadas. Trabajando con cultivos celulares (BF-2), hemos observado que todas las fracciones son funcionales y capaces de replicar, incluso las fracciones F1 y F2, lo que indica que ambas poseen viriones completos. Además, hemos observado que el incremento en el número de equivalentes conlleva un incremento de la infectividad de la partícula, siendo las partículas con un mayor contenido genómico las que alcanzan los mayores títulos, al igual que ocurría en IBDV. En los ensayos con peces, llevados a cabo en salmón y lenguado, las mortalidades fueron inferiores a las esperadas: solo la fracción F6 (con 3 equivalentes) muestra una elevada virulencia en ambas especies; las otras fracciones mostraron niveles de mortalidad intermedios, siendo especialmente bajos en F4 y F5. Basándonos en estos resultados, no podemos sugerir una relación clara entre el número de equivalentes genómicos y la virulencia, como cabría esperar tras los análisis de replicación *ex vivo*, lo que sugiere la necesidad de más experimentación en esta línea de trabajo.



CONCLUSIONES

1. La virulencia de las cepas de birnavirus acuáticos estudiadas no parece estar determinada por los residuos aminoacídicos presentes en las proteínas virales, relacionados hasta ahora con la virulencia; o, al menos, este no parece ser el único mecanismo que interviene en su regulación.
2. El *reassortment* en birnavirus acuáticos sí parece estar implicado en la regulación de virulencia, suponiendo un mecanismo de adaptación al hospedador, y favoreciendo la persistencia del virus. La frecuencia de este fenómeno *ex vivo* oscila entre un 10 y un 30%, y varía en función del tipo celular y el número de pases del clon celular.
3. Los análisis estadísticos revelan que el proceso de encapsidación de los segmentos durante la replicación viral no es un proceso al azar sino dirigido, y parece depender del tipo celular. Sin embargo, tras haber demostrado que la asociación de segmentos sí es un proceso aleatorio, y habiendo estudiado tres posibles escenarios que justifiquen un proceso de recombinación dirigido, queda pendiente demostrar cómo se produce esta regulación.
4. Queda demostrada la presencia de poliploidía en birnavirus acuáticos, observándose en estos virus poblaciones capaces de incorporar un número creciente de segmentos genómicos, hasta encapsidar 3 equivalentes genómicos completos. Este fenómeno supone además un cambio morfológico en la partícula viral, observándose poblaciones de entre 60 a 90 nm, aunque no tenemos datos para explicar cómo se produce este aumento de volumen de la partícula.

5. La poliploidía podría estar relacionada con la virulencia de este tipo de virus, al menos *ex vivo*, siendo las fracciones con un mayor número de equivalentes genómicos las que alcanzan mayores niveles de efectividad.



BIBLIOGRAFÍA

Ahmadivand, S., Soltani, M., Behdani, M., Evensen, Ø., Alirahimi, E., Soltani, E., Hassanzadeh, R., Ashrafi-Helan & J., 2018. VP2 (PTA motif) encoding DNA vaccine confers protection against lethal challenge with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in trout. *Mol. Immunol.* 94, 61–67.

Bahar, M. W., Sarin, L. P., Graham, S. C., Pang, J., Bamford, D. H., Stuart, D. I., Grimes & J. M., 2013. Structure of a VP1-VP3 complex suggests how birnaviruses package the VP1 polymerase. *J. Virol.* 87, 3229–36.

Baker, S. F., Nogales, A., Finch, C., Tuffy, K. M., Domm, W., Perez, D. R., Topham, D. J. & Martínez-Sobrido, L., 2014. Influenza A and B virus intertypic reassortment through compatible viral packaging signals. *J. Virol.* 88, 10778–91.

Beniac, D. R., Melito, P. L., Devarenes, S. L., Hiebert, S. L., Rabb, M. J., Lamboo, L. L., Jones, S. M. & Booth, T. F., 2012. The organisation of Ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS One* 7, e29608.

Blake, S., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S. & Nicholson, B. L., 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Organ.* 45, 89–102.

Boot, H. J., Hoekman, A. J. W. & Gielkens, A. L. J., 2005. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Arch. Virol.* 150, 137–44.

Bottcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A.V. & Crowther, R. A., 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71, 325–30.

Bowers, R. M., Lapatra, S. E. & Dhar, A. K., 2008. Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time

reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J. Virol. Methods* 147, 226–34.

Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R. A & Vakharia, V.N., 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75, 11974–82.

Bruslind, L. D. & Reno, P. W., 2000. Virulence Comparison of Three Buhl-Subtype Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Brook Trout Fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12, 301–15.

Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V, Bamford, D. H. & Stuart, D. I., 2001. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410, 235–40.

Calvert, J. G., Nagy, E., Soler, M. & Dobos, P., 1991. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 72, 2563–67.

Cárdenas, C., Carmona, M., Gallardo, A., Labra, A. & Marshall, S. H., 2014. Coexistence in field samples of two variants of the infectious salmon anemia virus: a putative shift to pathogenicity. *PLoS One* 9, e87832.

Caspar, D. L. & Klug, A., 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 1–24.

Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. & Steven, A. C., 1997. Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J. Cell Biol.* 138, 975–85.

Castón, J. R., Martínez-Torrecedrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. & Carrascosa, J. L., 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* 75, 10815–28.

Caswell-Reno, P., Reno, P. W. & Nicholson, B. L., 1986. Monoclonal Antibodies to Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Analysis of Viral Epitopes and Comparison of Different Isolates. *J. Gen. Virol.* 67, 2193–05.

- Chang, N., MacDonald, R. D. & Yamamoto, T., 1978.** Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Can. J. Microbiol.* 24, 19–27.
- Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. & Delmas, B., 2002.** The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76, 2384–92.
- Cheville, N. F., 1967.** Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *Am. J. Pathol.* 51, 527–51.
- Coetzee, P., Van Vuuren, M., Stokstad, M., Myrmel, M., van Gennip, R. G. P., van Rijn, P. A. & Venter, E. H., 2014.** Viral replication kinetics and in vitro cytopathogenicity of parental and reassortant strains of bluetongue virus serotype 1, 6 and 8. *Vet. Microbiol.* 171, 53–65
- Cohen, J. A., Poinsard, A. & Scherrer, R., 1973.** Physico-chemical and morphological features of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Gen. Virol.* 21, 485–98.
- Comai, L., 2005.** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6, 836–46.
- Cortez-San Martín, M., Villanueva, R. A., Jashés, M. & Sandino, A. M., 2009.** Molecular characterization of IPNV RNA replication intermediates during the viral infective cycle. *Virus Res.* 144, 344–49.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Delmas, & B. Rey, F. A., 2010.** Crystal structure of an Aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism. *J. Virol.* 84, 1792–99.
- Couve, E., Kiss, J. & Kuznar, J., 1992.** Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 899–06.
- Cutrin, J. M., Barja, J. L., Nicholson, B., & Bandin, I., 2004.** Restriction Fragment Length Polymorphisms and Sequence Analysis: An Approach for Genotyping Infectious Pancreatic Necrosis Virus Reference Strains and Other Aquabirnaviruses Isolated from Northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1059–67.

- Cutrín, J. M., Lago, M., Bandín, I., Areoso, E. & Dopazo, C. P., 2010.** Phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from wild fish in the Galician coastal waters (NW Spain). 8th Int. Symp. Viruses Low. Vertebr. Santiago Compostela.
- Delgui, L., Oña, A., Gutiérrez, S., Luque, D., Navarro, A., Castón, J. R. & Rodríguez, J. F., 2009.** The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology* 386, 360–72.
- Delmas, B., Attoui, H., Ghosh, S., Malik, Y. S., Mundt, E., Vakharia, V. N., Ictv Report Consortium, 2018.** ICTV virus taxonomy profile: Birnaviridae. *J. Gen. Virol.* 100 (1), 1–2.
- Desautels, D. & MacKellvie, R. M., 1975.** Practical Aspects of Survival and Destruction of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Fish. Res. Board Canada* 32, 523–31.
- Devold, M., Karlsen, M. & Nylund, A., 2006.** Sequence analysis of the fusion protein gene from infectious salmon anemia virus isolates: Evidence of recombination and reassortment. *J. Gen. Virol.* 87, 2031–40.
- Díaz-Muñoz, S. L., Tenailon, O., Goldhill, D., Brao, K., Turner, P. E. & Chao, L., 2013.** Electrophoretic mobility confirms reassortment bias among geographic isolates of segmented RNA phages. *BMC Evol.*, 13, 206.
- Dixon, P. F., Ngoh, G. H., Chang, S. F. Kueh, S. L. F. & Way, K., 2001.** A fourth birnavirus serogroup. 10th Int. Conf. EAAP, Dublin, Irel.
- Dobos, P., Hallett, R., Kells, D. T., Sorensen, O. & Rowe, D., 1977.** Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 22, 150–59.
- Dobos, P. & Rowe, D., 1977.** Peptide Map Comparison of Infectious Pancreatic Necrosis Virus-Specific Polypeptides. *J. Virol.* 24, 805–20.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. & Teninges, D., 1979.** Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32, 593–05.

Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. A. & Dobos, P., 1991. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* 181, 541–52.

Ellis, A. E., Cavaco, A., Petrie, A., Lockhart, K., Snow, M. & Collet, B., 2010. Histology, immunocytochemistry and qRT-PCR analysis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Fish Dis.* 33, 803–18.

Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P., 1991. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185, 291–8.

Eskildsen U. K. & Vestergard- Jorgensen, P. I., 1973. On the possible transfer of trout pathogenic viruses by gulls. *Riv. Ital. di Piscic. e ictiopatologia* 8, 104–06.

Espinoza, J. C. & Kuznar, J., 1997. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) does not require acid compartments for entry into cells. *Arch. Virol.* 142, 2303–08.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2018 El estado mundial de la pesca y y la acuicultura <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>

Ferrero, D., Garriga, D., Navarro, A., Rodríguez, J. F. & Verdager, N., 2015. Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. *J. Virol.* 89, 11165–68.

Gadan, K., Sandtrø, A., Marjara, I. S., Santi, N., Munang'andu & H. M., Evensen, Ø., 2013. Stress-Induced Reversion to Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Naïve Fry of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One* 8, e54656.

Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J. & Delmas, B., 2007. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 20774–84.

Garriga, D., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Castón, J. R., Rodriguez & J. F., 2006. The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J. Virol.* 80, 6895–05.

Gavazzi, C., Yver, M., Isel, C., Smyth, R. P., Rosa-Calatrava, M., Lina, B., Moulès, V. & Marquet, R., 2013. A functional sequence-specific interaction between influenza A virus genomic RNA segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16604–09.

Gerber, M., Isel, C., Moules, V. & Marquet, R., 2014. Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol.* 22, 446–55.

Goedhals, D., Bester, P. A., Paweska, J. T., Swanepoel, R. & Burt, F. J., 2014. Next-generation sequencing of southern African Crimean-Congo haemorrhagic fever virus isolates reveals a high frequency of M segment reassortment. *Epidemiol. Infect.* 142, 1952–62

Graham, S. C., Sarin, L. P., Bahar, M. W., Myers, R. a., Stuart, D. I., Bamford, D. H. & Grimes, J. M., 2011. The N-Terminus of the RNA polymerase from infectious pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment. *PLoS Pathog.* 7, e1002085.

Greenbaum, B. D., Li, O. T. W., Poon, L. L. M., Levine, A. J. & Rabadan, R., 2012. From the Cover: Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3341–46.

Hara, K., Nakazono, Y., Kashiwagi, T., Hamada, N. & Watanabe, H., 2013. Co-incorporation of the PB2 and PA polymerase subunits from human H3N2 influenza virus is a critical determinant of the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes. *J. Gen. Virol.* 94, 2406–16.

Hedrick, R. P., Fryer, J. L., Chen, S. N., Kou & G. H., 1983. Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathol.* 18, 91–97.

Heppell, J., Berthiaume, L., Tarrab, E., Lecomte, J. & Arella, M., 1992. Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.* 73, 2863–70.

Heppell, J., Tarrab, E., Berthiaume, L., Lecomte, J. & Arella, M., 1995a. Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76, 2091–96.

Heppell, J., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L., & Arella, M., 1995b. Strain Variability and Localization of Important Epitopes on the Major Structural Protein (VP2) of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology* 214, 40–49.

Hill, B.J., 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. *Microbial diseases of fish*, [Special Publication of the Society of General Microbiology, No. 9], 91–114.

Hill, B.J. & Way, K., 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* 5, 55–77.

Hjalmarsson, A., Carlemalm, E. & Everitt, E., 1999. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Identification of a VP3-Containing Ribonucleoprotein Core Structure and Evidence for O-Linked Glycosylation of the Capsid Protein VP2. *J. Virol.* 73, 3484–90.

Hon, C. C., Lam, T. Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y. F., Yip, C. W., Zeng, F., Lam, P. Y., Ng, P. T. W. & Leung, F. C. C., 2006. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J. Virol.* 80, 8503–09.

Hong, J. R., Gong, H. Y. & Wu, J. L., 2002. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* 295, 217–29.

Imajoh, M., Goto, T. & Oshima S., 2007. Characterization of cleavage sites and protease activity in the polyprotein precursor of Japanese marine aquabirnavirus and expression analysis of generated proteins by a VP4 protease activity in four distinct cell lines. *Arch. Virol.* 152, 1103–14.

Jaru-ampornpan, P., Narkpuk, J., Wanitchang, A. & Jongkaewwattana, A., 2014. Nucleoprotein of influenza B virus binds to its type A counterpart and disrupts influenza A viral polymerase complex formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 296–300.

Johansen, L. H., Eggset, G. & Sommer, A. I., 2009. Experimental IPN virus infection of Atlantic salmon parr; recurrence of IPN and effects on secondary bacterial infections in post-smolts. *Aquaculture* 290, 9–14.

Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., Zamarreño, N., Albar, J. P. & Ortín, J., 2008. Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8, 2077–88.

Julin, K., Johansen, L. H. & Sommer, A. I., 2009. Reference genes evaluated for use in infectious pancreatic necrosis virus real-time RT-qPCR assay applied during different stages of an infection. *J. Virol. Methods* 162, 30–39.

Julin, K., Johansen, L. H., Sommer, A. I. & Jørgensen, J. B., 2015. Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 38, 1005–19.

Kasanga, C. J., Yamaguchi, T., Munang'andu, H. M., Ohya, K. & Fukushi, H., 2013. Genomic sequence of an infectious bursal disease virus isolate from Zambia: classical attenuated segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A. *Arch. Virol.* 158, 685–89.

Kelly, R. K. & Loh, P. C., 1972. Electron Microscopical and Biochemical Characterization of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Virol.* 10, 824–34.

Kiley, M. P., Bowen, E. T. W., Eddy, G. A., Isaäcson, M., Johnson, K. M., McCormick, J. B., Murphy, F. A., Pattyn, S. R., Peters, D., Prozesky, O. W., Regnery, R. L., Simpson, D. I. H., Slenczka, W., Sureau, P., van der Groen, G., Webb, P. A. & Wulff, H., 1982. Filoviridae: a Taxonomic Home for Marburg and Ebola Viruses ? *Intervirology* 18, 24–32.

Kirsanovs, S., Klempa, B., Franke, R., Lee, M. H., Schönrich, G., Rang, A. & Kruger, D.H., 2010. Genetic reassortment between high-virulent and low-virulent Dobrava-Belgrade virus strains. *Virus Genes* 41, 319–28.

- Kochan, G., Gonzalez, D. & Rodriguez, J. F., 2003.** Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 148, 723–44.
- Kohlstaedt, L., Wang, J., Friedman, J., Rice, P. & Steitz, T., 1992.** Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783–90.
- Krogstad, J. & T. Håstein, K.R., 1989.** Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Norwegian Fish Farms. *Viruses Low. Vertebr.* 284–91.
- Laemmli, U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5.
- Lago, M., Bandín, I., Barja, J. L., Rodríguez, J. F. & Dopazo, C. P., 2010.** Virulence for cultured turbot and Senegalense Sole of aquatic birnaviruses from wild fish: analysis of factors of virulence. 8th Int. Symp. Viruses Low. Vertebr. Santiago Compostela.
- Lago, M., Crujeiras, A., Bandín, I. & Dopazo, C. P., 2013.** Ex vivo reassortment between IPNV strains. 16th Int. Conf. Dis. Fish Sellfish. Tampere.
- Lago, M., Cutrín, J. M., Casas, M., Bandín, I. & Dopazo, C. P., 2014.** A diversity study of aquabirnavirus isolates from wild fish from Flemish Cap fishery. 9th Int. Symp. Viruses Low. Vertebr. Málaga
- Lauksund, S., Greiner-Tollersrud, L., Chang, C. J. & Robertsen, B., 2015.** Infectious pancreatic necrosis virus proteins VP2, VP3, VP4 and VP5 antagonize IFN α 1 promoter activation while VP1 induces IFN α 1. *Virus Res.* 196, 113–21.
- Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. & Etteradossi, N., 2006.** Very virulent infectious bursal disease virus: Reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* 87, 209–16.
- Ledo, A., Dopazo, C. P., Lupiani, B., Barja, J. L. & Toranzo, A.E., 1987.** Incidencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en Galicia. *Cuad. Marisq. Publicaciones técnicas.* 12, 645–50.
- Ledo, A., Lupiani, B., Dopazo, C. P., Areoso, E. & Barja, J. L., 1990.** Fish viral infections in Northwest of Spain. *Microbiol. Sem* 6, 21–29.

Lightner, D. & Post, G., 1969. Morphological Characteristics of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Trout Pancreatic Tissue. *J. Fish. Res. Board Canada* 26, 2247–50.

Lin, J. G., Zhang, C. X. & Suzuki, S., 2005. An anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family from marine birnavirus inhibiting apoptosis of insect cells infected with baculovirus. *Virus Genes* 31, 185–93.

Liu, M. & Vakharia, V. N., 2004. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology* 330, 62–73.

Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F., 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73, 6973–83.

Lu, Z., Zhang, L., Wang, N., Chen, Y., Gao, L., Wang, Y., Gao, H., Gao, Y., Li, K., Qi, X. & Wang, X., 2015. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. *Virus Res.* 203, 92–5.

Lubeck, M. D., Palese, P. & Schulman, J. L., 1979. Nonrandom association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology* 95, 269–74.

Luque, D., Saugar, I., Rodríguez, J. F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martín, C. S., Velázquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. & Castón, J. R., 2007. Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J. Virol.* 81, 6869–78.

Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Castón, J. R., 2009. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2148–52.

Magyar, G. & Dobos, P., 1994. Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* 204, 580–9.

Malsberger, R. G. & Cerini, C. P., 1965. Multiplication of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Viral Diseases Poikilothermic Vertebr.* 126, 320–27.

Manning, D. S., Mason, C. L. & Leong, J.C., 1990. Cell-free translational analysis of the processing of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. *Virology* 179, 9–15.

Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J. A., Castón, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F., 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* 77, 6438–49.

McDonald, S. M., Aguayo, D., Gonzalez-Nilo, F. D. & Patton, J. T., 2009. Shared and group-specific features of the rotavirus RNA polymerase reveal potential determinants of gene reassortment restriction. *J. Virol.* 83, 6135–48.

McKnight, I. J. & Roberts, R. J., 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. N. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br. Vet. J.* 132, 76–85.

Méndez, F., de Garay, T., Rodríguez, D. & Rodríguez, J. F., 2015. Infectious bursal disease virus VP5 polypeptide: a phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination. *PLoS One* 10, e0123470.

Méndez Hernández, F., 2018. Estudio de la función y localización de la proteína no estructural VP5 del virus de la bursitis infecciosa. Tesis doctoral, UAM, Madrid.

Moreno, P., Oliveira, J. G., Labella, A., Cutrín, J. M., Baro, J. C., Borrego, J. J. & Dopazo, C. P., 2014. Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6560–71.

Moss, L. H. I. & Gravell, M., 1969. Ultrastructure and Sequential Development of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Virol.* 3, 52–58.

Müller, H. & Nitschke, R., 1987. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* 159, 174–7.

Munang'andu, H. M., Sandtrø, A., Mutoloki, S., Brudeseth, B. E., Santi, N. & Evensen, Ø., 2013. Immunogenicity and Cross Protective Ability of the Central VP2 Amino Acids of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One* 8, 1–10.

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D., 1995. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

Mutoloki, S., Munang'andu, H. M. & Evensen, Ø., 2013. Clinical and subclinical forms of infectious pancreatic necrosis virus infections show specific viral genetic fingerprints that link differences in virulence to immunogenicity. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1395-52.

Nagata, K., Kawaguchi, A. & Naito, T., 2008. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev. Med. Virol.* 18, 247–60.

Nibert, M. L., Margraf, R. L. & Coombs, K. M., 1996. Nonrandom segregation of parental alleles in reovirus reassortants. *J. Virol.* 70, 7295–300.

Nikolakaki, S. V, Nomikou, K., Koumbati, M., Mangana, O., Papanastassopoulou, M., Mertens, P. P. C. & Papadopoulos, O., 2005. Molecular analysis of the NS3/NS3A gene of Bluetongue virus isolates from the 1979 and 1998-2001 epizootics in Greece and their segregation into two distinct groups. *Virus Res.* 114, 6–14.

Nishizawa, T., Kinoshita, S. & Yoshimizu, M., 2005. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *J. Gen. Virol.* 86, 1973–1978.

Nobiron, I., Galloux, M., Henry, C., Torhy, C., Boudinot, P., Lejal, N., Da Costa, B. & Delmas, B., 2008. Genome and polypeptides characterization of *Tellina* virus 1 reveals a fifth genetic cluster in the Birnaviridae family. *Virology* 371, 350–61.

Nomikou, K., Hughes, J., Wash, R., Kellam, P., Breard, E., Zientara, S., Palmarini, M., Biek, R. & Mertens, P., 2015. Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of

Bluetongue Virus following European Invasion. *PLoS Pathog.* 11, e1005056.

Novoa, B., Barja, J. L. & Figueras, A., 1995a. Entry and sequential distribution of an aquatic birnavirus in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 131, 1–9.

Novoa, B., Rivas, C., Toranzo, A. E. & Figueras, A., 1995b. Pathogenicity of birnaviruses isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*): comparison with reference serotypes of IPNV. *Aquaculture* 130, 7–14.

O'Reilly, E.K. & Kao, C.C., 1998. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252, 287–03.

Ohashi, S., Matsumori, Y., Yanase, T., Yamakawa, M., Kato, T. & Tsuda, T., 2004. Evidence of an antigenic shift among Palyam serogroup orbiviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4610–4.

Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Barja, J. L. & Bandín, I., 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.* 90, 2940–51.

Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Castón, J. R. & Rodríguez, J. F., 2004. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* 322, 135–42.

Ørpetveit, I., Küntziger, T., Sindre, H., Rimstad, E. & Dannevig, B. H., 2012. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but do not replicate in, mammalian cells. *Viol. J.* 9, 228.

Park, J. W. & Jeong, G., 1996. Identification of VP3 as an important neutralising epitope from DRT strain, a Korean isolate of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Immunol.* 6, 207–19.

Park, J. G., Kim, D. S., Matthijssens, J., Kwon, H. J., Zeller, M., Alfajaro, M. M., Son, K. Y., Hosmillo, M., Ryu, E. H., Kim, J. Y., Lee, J. H., Park, S. J., Kang, M. Il, Kwon, J., Choi, J. S. & Cho,

K. O., 2014. Comparison of pathogenicities and nucleotide changes between porcine and bovine reassortant rotavirus strains possessing the same genotype constellation in piglets and calves. *Vet. Microbiol.* 172, 51–62.

Pedersen, T., Skjesol, A. & Jørgensen, J. B., 2007. VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interacts with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA. *J. Virol.* 81, 6652–63.

Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J. C., Palero, F. & González-Candelas, F., 2014. Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution* 30, 296–07.

Persson, R. H. & Macdonald, R. D., 1982. Evidence that infectious pancreatic necrosis virus has a genome-linked protein. *J. Virol.* 44, 437–43.

Petit, S., Lejal, N., Huet, J. C. & Delmas, B., 2000. Active Residues and Viral Substrate Cleavage Sites of the Protease of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Virol.* 74, 2057–66.

Plarre, H., Nylund, A., Karlsen, M., Brevik, Ø., Sæther, P. A. & Vike, S., 2012. Evolution of infectious salmon anaemia virus (ISA virus). *Arch. Virol.* 157, 2309–26.

Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W. P. & Cattaneo, R., 2002. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J.* 21, 2364–72.

Ramig, R.F., 1997. Genetics of the rotaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 225–55.

Reed, L. J. & Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27, 493–97.

Reno, P., Darley, S. & Savan, M., 1978. Infectious Pancreatic Necrosis: Experimental Induction of a Carrier State in Trout. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35(11), 1451-56.

Reyes-Cerpa, S., Reyes-López, F. E., Toro-Ascuy, D., Ibañez, J., Maisey, K., Sandino, A. M. & Imarai, M., 2012. IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 291–00

Riji J. K. & Richards, R. H., 1999. Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *J. Gen. Virol.* 80, 2061–65.

Rivas, C., Cepeda, C., Dopazo, C. P., Novoa, B., Noya, M. & Barja, J. L., 1993. Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture* 115, 183–94

Roberts, R. J., 2012. *Fish Pathology*. 4th edition, Wiley-Blackwell, Chichester, 2012.

Rodriguez Saint-Jean, S., Borrego, J. J. & Perez-Prieto, S. I., 2003. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods. *Adv. Virus Res.* 62, 113–65.

Romero-Brey, I., Bandín, I., Cutrín, J. M., Vakharia, V. N. & Dopazo, C. P., 2009. Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 32, 585–95.

Roner, M. R., Bassett, K. & Roehr, J., 2004. Identification of the 5' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virology* 329, 348–60.

Ruane, N. M., McCleary, S. J., McCarthy, L. J. & Henshilwood, K., 2014. Phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Ireland reveals the spread of a virulent genogroup 5 subtype previously associated with imports. *Arch. Virol.* 160, 817–24.

Salgado-Miranda, C., Rojas-Anaya, E., García-Espinosa, G., Loza-Rubio, E., 2014. Molecular characterization of the VP2 gene of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolates from Mexico. *J. Aquat. Anim. Health* 26, 43–51.

Sano, T., Okamoto, N. & Nishimura, T., 1981. A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J. Fish Dis.* 4, 127–39.

Sano, M., Okamoto, N., Fukuda, H., Saneyoshi, M. & Sano, T., 1992. Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *J. Fish Dis.* 15, 283–93.

Santi, N., Vakharia, V. N. & Evensen, Ø., 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322, 31–40.

Santi, N., Sandtrø, A., Sindre, H., Song, H., Hong, J. R., Thu, B., Wu, J. L., Vakharia, V. N. & Evensen, Ø., 2005a. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. *Virology* 342, 13–25.

Santi, N., Song, H., Vakharia, V. N. & Evensen, Ø., 2005b. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *J. Virol.* 79, 9206–16.

Scherrer, R., Bic, E. & Cohen, J., 1974. Infectious pancreatic necrosis virus: a study of the influence of temperature and host-cell on virus replication and virus-induced interferon synthesis. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 125, 455–67.

Shankar, K. M. & Yamamoto T., 1994. Prevalence and pathogenicity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) associated with feral lake trout, *Salvelinus namaycush* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 17, 461–71.

Shivappa, R. B., Song, H., Yao, K., Aas-Eng, A., Evensen, O. & Vakharia, V. N., 2004. Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis. Aquat. Organ.* 61, 23–32.

Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. & Duncan, R., 2002. Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology* 296, 241–50.

Simon-Loriere, E. & Holmes, E.C., 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 617–26.

Skjesol, A., Skjæveland, I., Elnæs, M., Timmerhaus, G., Fredriksen, B. N., Jørgensen, S., Krasnov, A., Jørgensen, J. B., 2011. IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virol. J.* 8, 396.

Smail, D.A., Bruno, D.W., Dear, G., McFarlane, L.A. & Ross, K., 1992. Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus Sp serotype in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts associated with mortality and clinical disease. *J. Fish Dis.* 15, 77–83.

Somogyi, P. & Dobos, P., 1980. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 33, 129–39.

Song, H., Santi, N., Evensen, O. & Vakharia, V. N., 2005. Molecular Determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Virulence and Cell Culture Adaptation. *J. Virol.* 79, 9206–16.

Sonstegard, R. A., McDermott, L. A. & Sonstegard, K. S., 1972. Isolation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from White Suckers (*Catostomus commersoni*). *Nature* 236, 174–75.

Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L. & Peeters, B. P., 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J. Gen. Virol.* 81, 209–18.

Tacken, M. G. J., Peeters, B. P. H., Thomas, A. A. M., Rottier, P. J. M. & Boot, H. J., 2002. Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.* 76, 11301–11.

Tacken, M. G. J., Thomas, A. A. M., Peeters, B. P. H., Rottier, P. J. M. & Boot, H. J., 2004. VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Arch. Virol.* 149, 2245–60.

Tarrab, E., Berthiaume, L., Heppell, J., Arella, M. & Lecomte, J., 1993. Antigenic characterization of serogroup “A” of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 9), 2025–30.

Toffolo, V., Negrisola, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L. & Dalla Valle, L., 2007. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 298–08.

Toranzo, A. E. & Metricic, F. M., 1982. Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Dis.* 5, 223–31.

Weber, S., Fichtner, D., Mettenleiter, T. C. & Mundt, E., 2001. Expression of VP5 of infectious pancreatic necrosis virus strain VR299 is initiated at the second in-frame start codon. *J. Gen. Virol.* 82, 805–12.

Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L. & Yu, L., 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 (Issue 2), 277–87.

Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H., Yu, X. & Yu, L., 2008. Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 131, 279–82.

Wolf, K., Snieszko, S. F. & Dunbar, C. E., 1959. Infectious pancreatic necrosis a virus caused disease of fish. *Excerpta Med.* 13, 228.

Wolf, K., 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Comstock Publishing Associates Cornell University Press, Ithaca NY, USA.

Wolf, K. & Quimby, M. C., 1971. Salmonid viruses: Infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 34, 144–56.

Wong, K. K. Y., Bull, R. A., Stelzer-Braid, S., Fennell, M. & Rawlinson, W., 2011. Effect of reassortment on the nucleotide and amino acid changes of human A/H3N2 RNP subunits during 1998–2009. *J. Clin. Virol.* 51, 270–85.

Wood, E. M., Snieszko, S. F. & Yasutake, W. T., 1955. Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *AMA. Arch. Pathol.* 60, 26–8.

Xu, H. T., Si, W. D. & Dobos, P., 2004. Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* 322, 199–10.

Yamaguchi, T., Ogawa, M., Miyoshi, M., Inoshima, Y., Fukushi, H. & Hirai, K., 1997. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 142, 1441–58.

Yamamoto, T., 1975. Frequency of Detection and Survival of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in a Carrier Population of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) in a Lake. *J. Fish. Res. Board Canada* 32, 568–70.

Ye, C., Wang, Y., Zhang, E., Han, X., Yu, Z. & Liu, H., 2017. VP1 and VP3 Are Required and Sufficient for Translation Initiation of Uncapped Infectious Bursal Disease Virus Genomic Double-Stranded RNA. *J. Virol.* 92 (2), e 01345–17.

Zhang, C. X. & Suzuki, S., 2003. Comparison of the RNA polymerase genes of marine birnavirus strains and other birnaviruses. *Arch. Virol.* 148, 745–58.

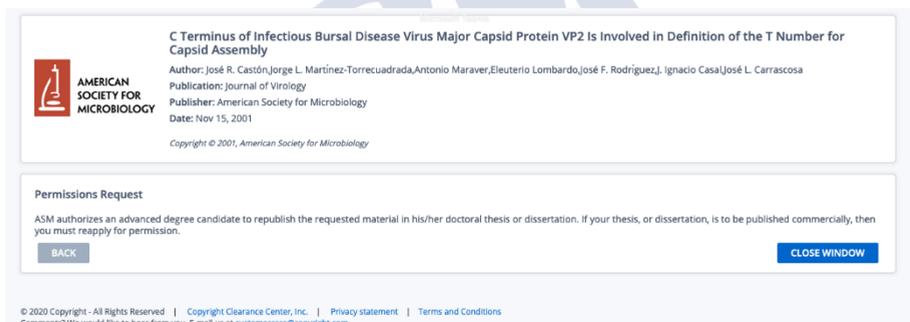
Zhang, C. X. & Suzuki, S., 2004. Aquabirnaviruses isolated from marine organisms form a distinct genogroup from other aquabirnaviruses. *J. Fish Dis.* 27, 633–43.





PERMISOS FIGURAS

Figura 2. Estructura de la cápside de birnavirus y proteínas estructurales. Tomada de: Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. & Carrascosa, J. L., 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* 75, 10815–28.



 **AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY**

C Terminus of Infectious Bursal Disease Virus Major Capsid Protein VP2 Is Involved in Definition of the T Number for Capsid Assembly

Author: José R. Castón, Jorge L. Martínez-Torrecuadrada, Antonio Maraver, Eleuterio Lombardo, José F. Rodríguez, Ignacio Casa, José L. Carrascosa
Publication: *Journal of Virology*
Publisher: American Society for Microbiology
Date: Nov 15, 2001

Copyright © 2001, American Society for Microbiology

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer-care@copyright.com

Figura 3. Estructura de VP1. Tomada de: Graham, S. C., Sarin, L. P., Bahar, M. W., Myers, R. a., Stuart, D. I., Bamford, D. H. & Grimes, J. M., 2011. The N-Terminus of the RNA polymerase from infectious pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment. *PLoS Pathog.* 7, e1002085.

Wednesday, October 28, 2020 at 13:15:30 Central European Standard Time

Asunto: RE: Asking for permission to use a figure
Fecha: miércoles, 28 de octubre de 2020, 13:11:55 (hora estándar de Europa central)
De: noreply@salesforce.com en nombre de PLOS Pathogens
A: PEREIRA DOPAZO CARLOS

Dear Dr Dopazo,

Thank you for your email. You are welcome to re-use the content from any PLOS articles.

All PLOS articles are published under a Creative Commons Attribution license (CC BY), further information about the terms of the license can be found at: <https://www.plos.org/license>.

All of our articles are available (through our websites) for anyone to download, re-use, reprint, modify, distribute, and/or copy so long as the original authors and source are cited.

Please let me know if you require any further assistance.

Kind regards,

Emma Darkin
Staff EO
On behalf of PLOS Pathogens

Case Number: 06867821
ref:_00DU0Ifis_5004P1Jdt2C:ref

Figura 4. Estructura de VP2. Tomada de: Coulibaly, F., Chevalier, C., Delmas, & B. Rey, F. A., 2010. Crystal structure of an Aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism. *J. Virol.* 84, 1792–99.



Crystal Structure of an Aquabirnavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism
Author: Fasséli Coulibaly, Christophe Chevalier, Bernard Delmas, Félix A. Rey
Publication: *Journal of Virology*
Publisher: American Society for Microbiology
Date: Jan 22, 2010
Copyright © 2010, American Society for Microbiology

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer-care@copyright.com

Figura 5. Clasificación genotípica de Blake y col. 2001. Tomada de: Blake, S., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S. & Nicholson, B. L., 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. Dis. Aquat. Organ. 45, 89–102.

Monday, November 2, 2020 at 09:35:39 Central European Standard Time

Asunto: Re: Asking for permission to use a figure

Fecha: lunes, 2 de noviembre de 2020, 9:20:01 (hora estándar de Europa central)

De: Ian Stewart

A: mpdopazo@gmail.com

Dear Carlos

Asserting that Inter-Research is the copyright holder, Maria Lago is hereby licensed to reproduce Fig. 3 of Blake S, Ma JY, Caporale DA, Jairath S, Nicholson BL (2001) Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA, Dis Aquat Org 45:89–102 in her thesis "Study of factors involved in the mechanisms of virulence of IPNV Type viruses (Estudio de factores implicados en los mecanismos de virulencia de virus Tipo IPNV) to be submitted to the University of Santiago de Compostela. The original source of publication (i.e. DAO) must be clearly cited in the conventional manner.

Additionally, just in case you have not noticed it, Fig. 3 was corrected after publication (see: [Erratum-Blake](#)) so please make sure the correct version is used / reproduced.

With best wishes

Ian Stewart
Rights and Permissions
Inter-Research



**ANEXO:
(PUBLICACIONES)**





Aquabirnavirus polyploidy: a new strategy to modulate virulence?

M. Lago,¹ José F. Rodríguez,² I. Bandín¹ and C. P. Dopazo¹

Correspondence

C. P. Dopazo
carlos.pereira@usc.es

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15706, Spain

²Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 24 December 2015
Accepted 19 February 2016

One of the main research issues regarding infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is its virulence mechanisms. The basis for understanding the molecular virulence determinants of this virus was established over the last decade when it was demonstrated that certain amino acid domains in the VP2 and VP2–NS inter-region determined the level of virulence of IPNV. However, certain variability was still inexplicable and therefore other factors may also be involved. To this end, it was demonstrated recently that infectious bursal disease virus (IBDV), a virus in a different genus of the same family as IPNV, can package more than two dsRNA segments, and that polyploidy may be associated with virulence. In the present report, we analysed the viral fractions obtained after gradient centrifugation to demonstrate that IPNV virions can also package more than two segments, thus indicating that polyploidy is a common birnavirus trait. The differential replication *ex vivo* and virulence *in vivo* additionally suggested that such a characteristic is involved in the modulation of virus infectivity. However, although the *ex vivo* results clearly demonstrated that the replication capacity was enhanced as the viral ploidy increased, the *in vivo* results could not strongly support a direct relationship between ploidy and virulence to the host, thus suggesting that other virulence determinants are also involved.

INTRODUCTION

Aquatic birnaviruses, including infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), have been detected and isolated from both asymptomatic and acutely diseased specimens belonging to an extensive range of aquatic animals worldwide. IPNV belongs to the genus *Aquabirnavirus* and *Infectious pancreatic necrosis virus* is the prototype species of the family *Birnaviridae*. IPNV particles are non-enveloped icosahedrons ($T=13$ *levo* symmetry) of ~70 nm in diameter enclosing a bisegmented dsRNA genome (Lightner & Post, 1969; Cohen *et al.*, 1973; Dobos, 1977). Segment A, which comprises nt 2962–3097 depending on the virus strain, contains two partially overlapping ORFs. The smaller one, located at the 5' end, encodes VP5, a non-structural polypeptide (Duncan *et al.*, 1987; Magyar & Dobos, 1994; Dobos, 1995a). VP5 is not essential for virus replication and, although it seems to be associated with virulence, its specific function remains to be characterized (Santi *et al.*, 2005). The larger ORF encodes a polyprotein that, through co-translational proteolytic processing, yields pVP2 (the precursor of the VP2 capsid polypeptide), VP3 and VP4 polypeptides. VP2, the capsid protein, is related to virulence (Heppell *et al.*, 1995; Blake *et al.*, 2001; Santi *et al.*, 2004). VP3 is a modular, self-oligomerizing protein that interacts with

dsRNA and VP1, thus suggesting its involvement in RNA replication and genome packaging. VP3 also acts as a scaffolding protein, contributing to the correct assembly of the pVP2 capsomers (Pedersen *et al.*, 2007). VP4 is the autocatalytic protease responsible for polyprotein cleavage. Segment B (~2900 bp) contains one ORF encoding VP1, the viral RNA-dependent RNA polymerase (Duncan *et al.*, 1991; Dobos, 1995b).

Aquabirnaviruses were initially grouped into 10 serotypes (Hill & Way, 1995), with a certain relationship to the geographical origin. The genotyping of these viruses by Blake *et al.* (2001) also demonstrated some correlation between serotyping and the geographical origin of the strains. However, attempts to correlate the strain type with the level of virulence were fruitless; only with two strains, West Buxton (WB; serotype A1, genotype 1) and Abild (Ab; serotype A3, genotype 3), has a marked relatedness to high and low virulence, respectively, been presumed, at least for salmonid fish (Vestergård Jørgensen & Grauballe, 1971). However, in challenge studies performed by our group with different variants of WB and Ab strains, a certain variability in virulence levels was observed that could not be explained by either the type or the origin of the strain (Lago *et al.*, 2010). Santi *et al.* (2004), studying the variable virulence of the Sp strain

(serotype A2, genotype 5) demonstrated that these changes could be due to sequence variations in specific regions of the VP2 capsid protein. Other authors (Lago *et al.*, 2010, 2013) suggested that segment reassortment could also contribute to the modulation of the virulence in these types of viruses.

Recently, data gathered on infectious bursal disease virus (IBDV), the only known member of the genus *Avibirnavirus*, have suggested the existence of an as-yet-unexplored biological feature that might significantly affect birnavirus virulence. Work by Luque *et al.* (2009) demonstrated that most IBDV infectious particles harbour more than a single genomic equivalent, and suggested that polyploidy could influence virus virulence. In the present study, we have shown that IPNV virions are also polypliod, thus indicating that polyploidy is a common birnavirus trait. Additionally, we assessed the impact of IPNV polyploidy on virus replication *ex vivo* and on virulence *in vivo*.

RESULTS

Although the results were similar regardless of the strain assayed, the data provided here are those from the 5B1_E strain, given that more replicates were performed in all assays.

Composition of CsCl gradient viral subpopulations

As shown in Fig. 1, CsCl gradient purification of the IPNV tested strains yielded two to six virus bands. The bands

occurred at densities of 1.280 ± 0.021 , 1.300 ± 0.044 , 1.306 ± 0.004 , 1.310 ± 0.05 , 1.314 ± 0.006 and 1.323 ± 0.007 g ml⁻¹ (from top to bottom). Following the notation used by Luque *et al.* (2009), fractions were named F1 (gradient top) to F6 (bottom). The relative abundance of the different virus fractions was roughly consistent in all experiments. F1 and F2 were consistently under-represented, while F6 always encompassed more than 50 % of the total purified virus. Occasionally, in some batches, the abundance of F1 was higher than all other bands except for F6 (Fig. 1c). It is worth noting that the number of bands visualized was highly dependent on the quantity of virus produced for purification.

Electron microscopy analysis of the different gradient fractions revealed the presence of three main particle species, namely *T*=1 subviral particles (SVPs) (25 nm in diameter), *T*=7 particles (~55 nm in diameter) and *T*=13 (with sizes ranging from 65 to 90 nm), similar to those described previously for IBDV.

The composition of the first two fractions was conspicuously different from the rest (Fig. 2). F1 and F2 comprised mixed populations formed by a high proportion of *T*=1 along with a low proportion of *T*=7 particles, as well as some empty, broken and apparently intact *T*=13 particles. Fractions F3–F6 exclusively contained complete *T*=13 particles with diameters ranging from 65 to 90 nm (as shown in Fig. 3, and described below). The high structural heterogeneity of F1 and F2, when compared with the F3–F6 subpopulations, prevented their use in subsequent stoichiometry analyses.

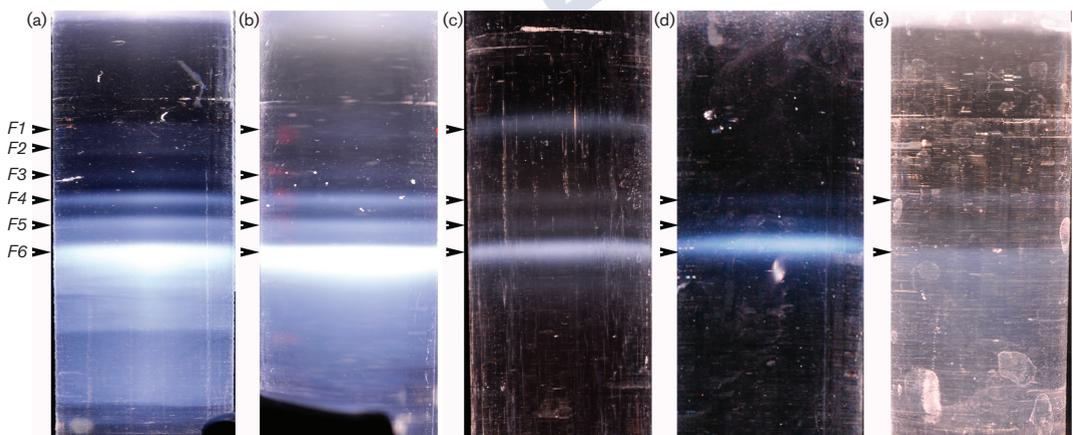


Fig. 1. Viral fractions (of strain 5B1_E) visualized after ultracentrifugation through a CsCl gradient. A maximum of six fractions was observed and these were named F1–F6 from the lowest to the highest density. The densities of the bands were (mean \pm sd) 1.280 ± 0.021 , 1.300 ± 0.044 , 1.306 ± 0.004 , 1.310 ± 0.05 , 1.314 ± 0.006 and 1.323 ± 0.007 g ml⁻¹, respectively. Panels (a)–(e) show the different number of bands (fractions) visualized among all the purifications performed, which was regardless of the strain but dependent on the quantity of virus purified.

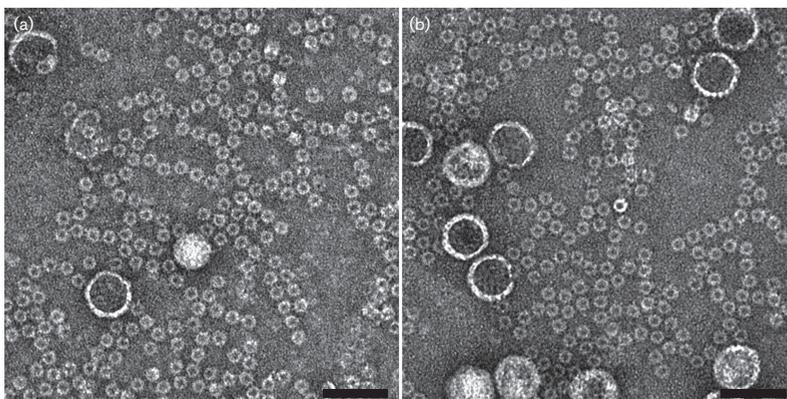


Fig. 2. Electron microscopy of populations from fractions F1 (a) and F2 (b) (strain 5B1_E) negatively stained with 2 % uranyl acetate. These populations were mainly made up of SVPs and empty and broken particles; complete particles were observed in a lower proportion in both fractions. Bars, 100 nm.

Protein analysis

SDS-PAGE revealed that fractions F3–F6 had a similar protein composition (Fig. 4) of VP1 (94 kDa), VP2 (54 kDa), VP3 (31 kDa) and VP4 (24 kDa), although VP4 was only detected by Coomassie blue staining and not by Western blotting. VP1 was not detected in F1 and only faintly visualized after Western blotting in F2. VP3 was only faintly visualized in F1 after Western blotting, and VP4 was not detectable in F1 and F2. It was remarkable that the quantity of VP2 in F1 was at least as high as in F6, considering the extremely low proportion of virions in the first fraction. We must point out that, although the results shown here were for strain 5B1_E, the same pattern was observed when the Ab and WB strains were assayed.

Genomic analysis

Electrophoresis of the dsRNA from the six virus fractions was performed using fraction samples containing identical protein concentrations. Due to both the low abundance of fractions F1 and F2 and the observed structural heterogeneity detected in F1 and F2, F3 was used as the reference to equalize fractions F3–F6, in terms of protein concentration.

As shown in Fig. 5, the silver-stained gels revealed a proportionally increasing amount of viral RNA from F3 to F6. We assumed that, similarly to what has been shown for IBDV (Luque *et al.*, 2009), F3 viral particles contained two genome segments. We used MultiGauge v.3.0 and ImageJ software to normalize the intensity of both dsRNA bands in the four fractions. The results gathered from the analysis of data corresponding to 15 independent purification batches indicated that the relative amounts of viral RNA in fractions F4, F5 and F6 were 1.58 ± 0.13 -, 2.18 ± 0.13 - and 3.04 ± 0.33 -fold (mean \pm SD) higher than

that of F3, respectively. Analysis of these data indicated that F4 virions contained three dsRNA segments, while F5 and F6 harboured four (two genome equivalents) and six (three genome equivalents) segments, respectively. Interestingly, the relative intensities of the upper band with respect to the lower one in fractions F3–F6 were 1.1, 2.3, 1.2 and 1.2, respectively, which indicated that the majority of virions present in fraction F4 contained two copies of segment A and one of segment B. All these observations were similar, regardless of the IPNV strain assayed.

Particle size

Evaluation of the particle size found in each fraction, performed on over 30 virus purification batches, revealed that, although fractions F3–F6 were mostly made up of $T=13$ particles, there were significant size variations, both inter- and intra-fraction (Fig. 3). In F3, a few small particles of ~ 55 nm (most likely corresponding to $T=7$ particles) were visualized, and some of ~ 80 nm. Most of the particles in this fraction (~ 85 %) were in the 65–75 nm range, although the most frequently visualized size had a mean value of 70.66 ± 1.68 nm. Particles measuring ~ 55 nm were also observed, although in a low proportion (0.9 %), in fraction F4, in which a few 80 nm particles were also present. The diameter of most virions in this fraction was ~ 75 nm (75.67 ± 0.90), as in fractions F5 (75.99 ± 1.43) and F6 (75.86 ± 0.93). Particles of 55 nm were not detected in F5 and F6, where the smallest particles had diameters of ~ 65 nm. The largest visualized particles in F6 were ~ 80 nm, a particle size also present in F5. The largest particles (~ 90 nm) were occasionally detected only in fraction F5. It is worth highlighting that, in contrast to smaller particles, the contour of these large particles has a globose, less icosahedral appearance than their smaller

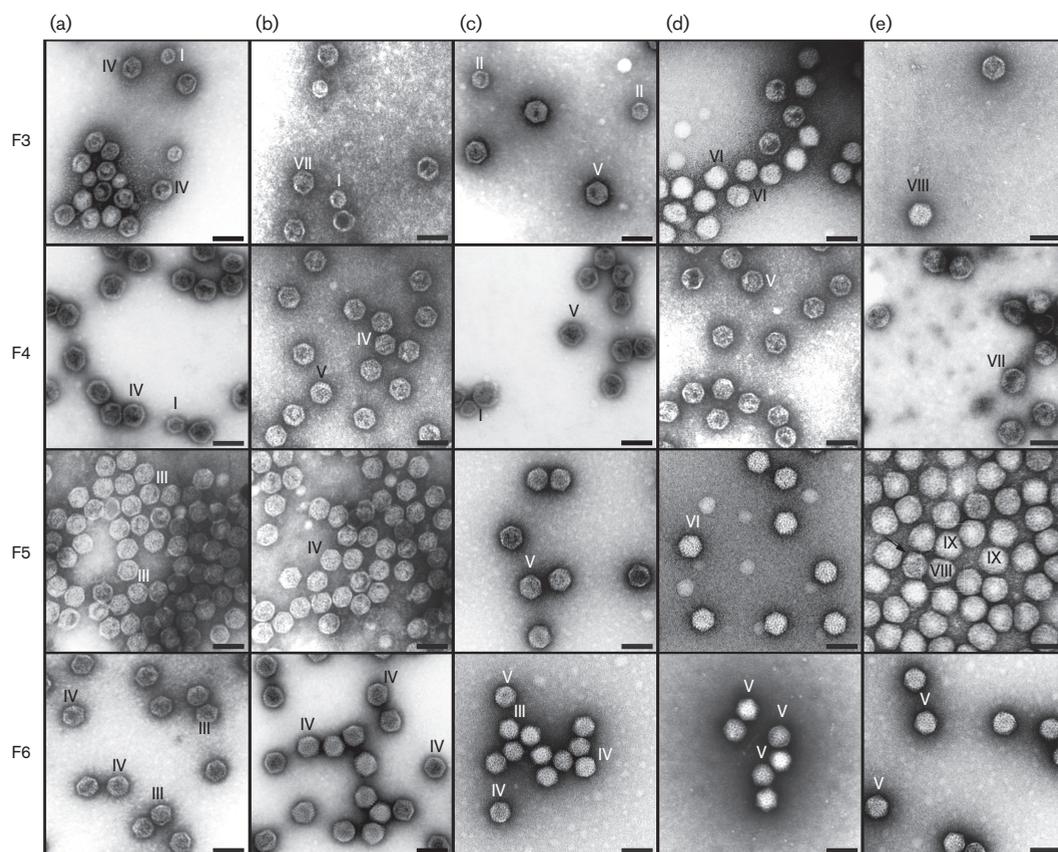


Fig. 3. Electron microscopy of populations of fractions F3–F6 (strain 5B1_E) negatively stained with 2 % uranyl acetate. Roman numerals show the approximate sizes of some of the particles as a reference: I, ~55 nm; II, ~65 nm; III, 65–70 nm; IV, ~70 nm; V, 70–75 nm; VI, ~75 nm; VII, 75–80 nm; VIII, ~80 nm; IX, ~90 nm. Five different pictures from each fraction (a–e) are shown.

counterparts (Fig. 3e). Similar particle size distributions were found in all tested IPNV strains.

Differential replication *ex vivo*

For this assay, fractions F3–F6 were used directly (no cell-culture propagation was applied before the *ex vivo* assay). The virus from all four fractions under study (F3–F6) induced the characteristic IPNV cytopathic effect in BF-2 monolayers, with those with a higher number of genome equivalents yielding higher titres: particles from F3 yielded 6.3×10^7 TCID₅₀ ml⁻¹ (7.8 ± 0.51 , when represented as log of TCID₅₀ ml⁻¹ \pm SD from five replicas); F4 particles provided titres of $\sim 8.9 \times 10^8$ TCID₅₀ ml⁻¹ (8.95 ± 0.37); F5 particles produced 3.2×10^9 TCID₅₀ ml⁻¹ (9.5 ± 0.18) and F6 particles produced 1×10^{10} TCID₅₀ ml⁻¹ (10.0 ± 0.88).

Differential virulence *in vivo*

Challenges in fish [sole (*Solea senegalensis*) and salmon (*Salmo salar*)] were performed with fractions from each of the three strains listed above. Only with strain 5B1_E was the assay repeated twice with both fish species. Although the results were basically similar in all cases, we present here only those obtained with 5B1_E. The challenges with sole were performed for a maximum of 30 days (Fig. 6a). Mortality rates were low; thus, F5 induced a maximum cumulative mortality (CM) of 3 %, while F3 was 7 % and F6 was only 20 %. No deaths were recorded in the group challenged with F4. The fish did not show significant symptoms; however, it should be noted that the fish inoculated with fraction F6 developed anorexia. The virus was reisolated and detected by direct reverse transcription (RT)-PCR plus nested-PCR, as well as by

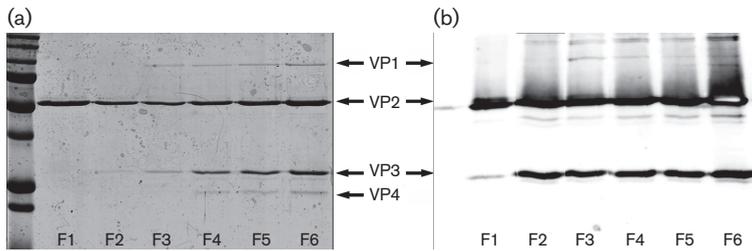


Fig. 4. Protein composition of fractions F1–F6 obtained by SDS-PAGE and Coomassie blue staining (a) and after Western blotting (b).

quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR), from all sampled individuals, both dead and surviving. The cycle threshold (C_t) values observed in RT-qPCR ranged from 19 to 31 in dead fish and from 36 to 39 in surviving individuals.

The salmon challenge experiment was performed in two stages. In an initial stage, no fish died (and no symptoms were recorded) for 20 days post-infection (p.i.) with any of the virus fractions. After a second dose with the corresponding fraction, mortalities were recorded over an extra 20-day period (Fig. 6b). Again, F4 yielded an extremely low CM (4 %) and F5 was just 17 %. Fish challenged with fraction F3 showed an intermediate mortality rate of 57 % at 14 days p.i., and fraction F6 yielded the highest rate (100 %) at day 15 p.i. The virus was reisolated and detected by RT-PCR plus nested-PCR, and by RT-qPCR from both dead and surviving fish. The C_t values observed in RT-qPCR ranged from 18 to 23 in dead fish, and from 34 to 38 in surviving individuals. Some of the fish

inoculated with F6 and (at a lower proportion) with F3 showed the classic symptoms of dark pigmentation, exophthalmia and abnormal swimming (data not shown).

DISCUSSION

At present, there are relatively few studies on the virulence factors of IPNV, and they are mainly focused on the connection of virulence to specific regions and residues of the genomic sequence (Sano *et al.*, 1992; Bruslind & Reno, 2000; Santi *et al.*, 2004; Shivappa *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Another well-known determinant of virulence is reassortment (Schrauwen *et al.*, 2014), which has been suggested to be responsible for the existence of virulent variants among other viruses (Cárdenas *et al.*, 2014). Although some studies conducted by our group with IPNV have suggested a possible implication of reassortment in the modulation of virulence (Lago *et al.*, 2010), the poor reproducibility of results obtained in some challenge

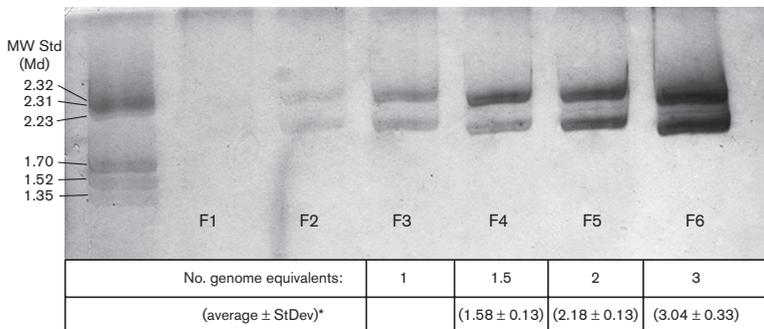


Fig. 5. RNA patterns obtained by SPS-PAGE and silver staining. The same amount of protein was analysed for fractions F3–F6. The intensity of the bands was quantified and normalized with respect to the F3 population value. The relative densities of the bands were calculated in reference to this fraction, yielding the following values (*mean ± SD for more than 15 gels): 1.58 ± 0.13, 2.18 ± 0.13 and 3.04 ± 0.33 for fractions F4–F6, respectively, which corresponded to one, one and a half, two and three genome equivalents, from F3 to F6, respectively. MW Std (Md), Molecular weight standards in mega Daltons.

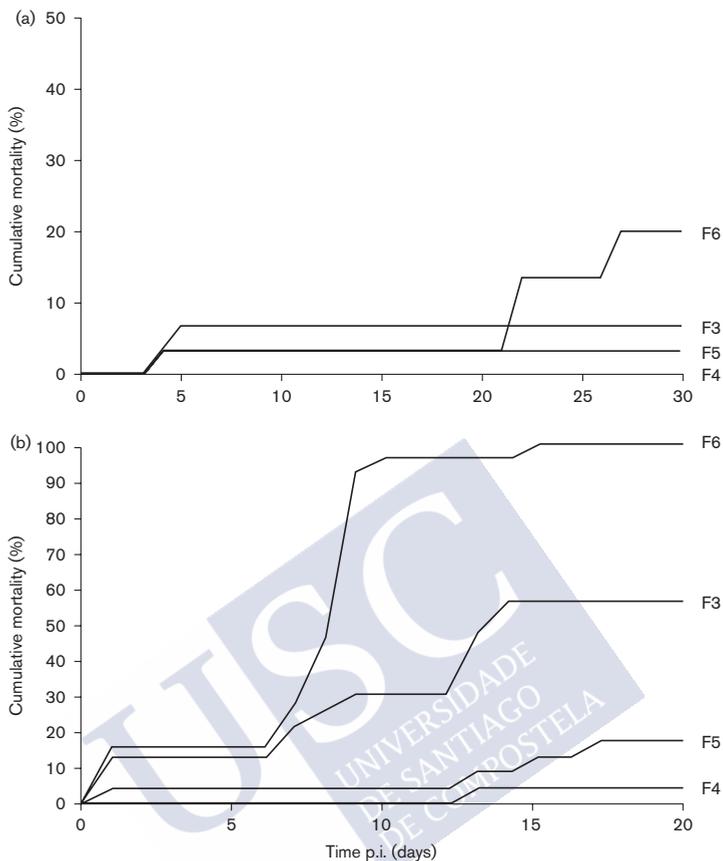


Fig. 6. Curves of cumulative mortality in challenges performed with 5B1E fractions on sole (*Solea senegalensis*) (a) and salmon (*Salmo salar*) (b). The curve for salmon represents the days post-infection (p.i.) after the secondary inoculation of the fraction.

trials led us to suspect that there had to be some additional strain-related virulence determinants.

It has been reported that the avibirnavirus IBDV is polyploid (Luque *et al.*, 2009). These authors also showed that such characteristics played a role in modulation of virus infectivity through the packaging of different numbers of genome copies. Polyploidy has also been found in several non-icosahedral virus families (e.g. families *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae* and *Filoviridae*), which use it to modulate their virulence (Enami *et al.*, 1991; Rager *et al.*, 2002; Beniac *et al.*, 2012). Therefore, our first objective was to determine whether aquabirnaviruses could also be polyploid. In the present study, the visualization of higher numbers of bands in CsCl gradients was clearly related to the original quantity of virus: the patterns of bands 5 and 6 were only obtained when high-titre virus

stocks were used for purification. Among the six fractions, only F1 and F2 showed a protein composition clearly consistent with that reported for SVPs (Coulibaly *et al.*, 2010), which were most represented in both fractions. The expected protein pattern of IPNV virions was obtained in the remaining four fractions, corresponding to complete $T=13$ icosahedral particles. This was why only these four populations were considered for the stoichiometry analysis of the genomic composition. The results – equalizing the quantity of virus among the fractions – clearly demonstrated that populations with higher density incorporated larger amounts of viral genome. Using F3 as the reference population, and hypothesizing that its particles would incorporate a single set of segments A and B (one genomic equivalent), the IPNV virions would be able to incorporate up to three genome equivalents (three copies of both

segments in fraction F6). F5 virions would have two sets of segments (two genomic equivalents) and, interestingly, the genome of virions in fraction F4 would be comprised of two copies of segment A and a single copy of segment B (1.5 genomic equivalents). In a previous report by Luque *et al.* (2009), the authors demonstrated that IBDV virions could package up to four copies of dsRNA corresponding to two genome equivalents, and that all the fractions showed equimolar amounts of both segments. It could be argued that, like Luque *et al.* (2009) with IBDV, we should have considered the F2 fraction as the reference, which would have yielded a similar result of maximum numbers of genome equivalents for both viruses. However, unlike IBDV, the F2 IPNV fraction was not composed of $T=13$ virions but mostly by SVPs. Nevertheless, even considering the hypothetical case that the very few $T=13$ particles present in the F2 fractions were composed of two genome segments and that virions in fractions F3–F6 packaged increasing numbers of genome equivalents, to our understanding the important fact is simply that IPNV, like IBDV, is also polyploid.

Polyploidy can represent a problem when it comes to packaging the genome during the morphogenesis as, a priori, it needs the enlargement of the ‘container’, which is a well-known phenomenon in eukaryotic cells (Comai, 2005). This fact does not represent a problem for helical viruses such as those mentioned above, as they are more permissive with regard to genome equivalent variations. Furthermore, in the case of filovirus, the particle can modify its length to incorporate up to 22 genome copies (Beniac *et al.*, 2012). However, this fact is not always related to an increase in virulence, as it has been demonstrated that high virulence is sometimes associated with shorter virus filaments (Kiley *et al.*, 1982).

The increasing of the shell volume has tight constraints in icosahedral viruses, whose capsids contain a well-defined cargo space. In this regard, it was reported that IBDV is able to encapsidate four dsRNA copies without being associated with an increase in its size (Luque *et al.*, 2009). This may be possible because these viruses have a much larger capsid than is necessary to enclose a single genome copy (Castón *et al.*, 1997).

In the present study, IPNV virions were able to enclose up to at least three copies of the genome. However, in contrast to IBDV, IPNV virions do increase their size when they incorporate more than one genome equivalent. It has been reported that the aquabirnavirus capsid varies from 55 to 74 nm, with 60 nm being the most frequent size (Lightner & Post, 1969; Moss & Gravell, 1969; Kelly & Loh, 1972; Chang *et al.*, 1978). However, our results showed that 60–65 nm particles were present – in variable but low percentages – in most fractions and that the most frequent sizes were ~70 nm (in F3) and 75 nm (in the remaining three populations). An increasing number of 80 nm particles were observed from the F3–F6 fractions and some particles measuring ~90 nm were only visualized in the F5 population.

Considering the mean size of the most frequent particles, the volume of the virions would be approximately 2.720, 2.783, 2.787 and 2.785 nm³ from F3 to F6, respectively. Therefore, a direct relationship between the number of packaged genome equivalents and the volume of the capsid was not observed. We cannot explain our observations. However, they are a fact demonstrated by a large number of measurements from many experiments.

The *ex vivo* replication study showed that all fractions were functional and able to replicate in BF-2 monolayers. In addition, it was observed that higher genome equivalents were associated with higher yields of viral titres in the infected monolayers. This clearly indicates that polyploidy is related to the infectivity of IPNV, a phenomenon already reported for IBDV (Luque *et al.*, 2009). Regarding the *in vivo* challenges, we employed two fish species that we have been testing with IPNV-like particles over a long time, and therefore we could expect predictable results. In this regard, in the case of experiments using sole fry, the mortalities were lower than expected from previous experiments. In the case of the challenges performed with salmon, the natural host species of the virus, we used young juvenile instead of fry in order to reduce the expected virulence of the virus, which was demonstrated by the fact that neither morbidity nor mortality was observed 20 days after the first inoculation. Only after a second inoculation of the same fraction were morbidity and mortality recorded, and the virus was detected and reisolated from the fish tissues. Based on the results from the *ex vivo* experiment, we also expected to observe a clear correlation between the infectivity of each fraction and the number of genome equivalents of the virions *in vivo*. Unfortunately, only fraction F6 (with three genome equivalents) showed the highest virulence in both species, clearly higher than that of the remaining fractions; F4 and F5 showed very low infectivity in both species, and F3 yielded intermediate levels of CM in both cases.

Further studies must be conducted, combining the three virulence determinants (specific amino acid residues, reassortment and polyploidy) and the host factor, for a better understanding of the pathogenesis of these viruses.

In conclusion, we can say that our results clearly demonstrated that polyploidy also exists among aquabirnavirus, as has been demonstrated previously for avibirnavirus, and that it may represent a mechanism to modulate its infectivity.

METHODS

Cell lines, viral strains and virus titration. Monolayers of BF-2 cells (Bluegill caudal trunk; ATCC CCL-91) were grown at 20 °C in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10 % FBS, 100 U penicillin ml⁻¹ and 100 µg streptomycin ml⁻¹. Virus infections were performed at an m.o.i. of 0.1 in 25 confluent BF-2 cell monolayers grown in 150 cm² flasks. The IPNV strains used in our study were the WB and Ab reference strains, as well as 5B1_E, which is a

WB/Ab (segments A/B) reassortant strain isolated from cod (*Gadus morhua*) in the Flemish Cap fishery (Romero-Brey *et al.*, 2009).

Virus titrations were performed in 96-well plates with semi-confluent BF-2 monolayers, using the end-point dilution method. After 10 days of incubation at 15 °C, titres were calculated by the Reed & Muench (1938) method.

Virus purification. For each purification, at least 20 semi-confluent BF-2 monolayers grown in 150 cm² flasks were employed to propagate each of the three strains. When cytopathic effect was complete, the cell medium was collected and centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant was incubated for 24 h at 4 °C with 5 % polyethylene glycol 8000 and 0.5 M NaCl. The virus was then pelleted at 8000 g for 30 min and resuspended in PES buffer [25 mM piperazine-*N,N*-bis(2-ethanesulfonic acid) (pH 6.2), 150 mM NaCl and 20 mM CaCl₂] supplemented with protease inhibitors (Roche). After pelleting through a 25 % sucrose cushion at 35 000 r.p.m. in an SW55Ti Beckman Coulter rotor for 1 h at 4 °C, the virus was resuspended in 500 µl PES buffer and loaded onto a CsCl gradient (1.33 g ml⁻¹) and centrifuged for 20 h at 31 000 r.p.m. at 4 °C in a SW32Ti rotor (Beckman Coulter). Virus bands were visualized by means of a light beam projected along the longitudinal axis from the bottom of the tubes. When the expected six virus fractions (named F1–F6, from the upper to the lower band) were visualized, they were collected by side puncture and dialysed against PES buffer over 24 h at 4 °C. When a lower number of bands was visualized, the assay was rejected.

Analysis of the protein and genomic composition of fractions F1–F6. Prior to electrophoresis, the amount of protein in fractions F3–F6 was determined using a BCA protein assay kit (Roche). Aliquots of each fraction were adjusted to the same protein concentration, and then subjected to overnight digestion with proteinase K (2 mg ml⁻¹) in the presence of 0.5 % SDS at 37 °C. Afterwards, the samples were denatured at 98 °C for 5 min and subjected to 7.5 % SDS-PAGE (Laemmli, 1970) at 150 V for 4 h. RNA bands were detected by staining with either Red Safe (ABM) or silver stained using a Silver Stain Plus kit (Bio-Rad). The bands were quantified using MultiGauge v.3.0 (FujiFilm) and ImageJ software (NIH). Genomic proportions were normalized using the population harbouring a lower concentration of genomic segments (F3) as a reference.

For the characterization of protein composition, one aliquot of each fraction was denatured by incubation at 98 °C for 3 min and subjected to 12 % SDS-PAGE. Gels were then either stained with colloidal Coomassie blue or subjected to Western blotting using an anti-IPNV Sp type polyclonal antibody and visualized by chemiluminescence (GE Healthcare).

Electron microscopy. Aliquots of 2 µl of each sample were loaded onto carbon-coated grids. After drying, the grids were stained with 2 % aqueous uranyl acetate for 2 min, drained and washed. Micrographs were recorded with a 200 kV JEOL electron microscope operating at 120 kV at a nominal magnification.

Experimental challenge. For the *in vivo* assays, two fish species were selected: Atlantic salmon (*Salmo salar*), a species widely recognized as susceptible to the virus, and Senegalese sole (*Solea senegalensis*), a species of great interest in our area and for which we have demonstrated that certain IPNV strains can produce morbidity and mortality (Lago *et al.*, 2010). Two hundred Atlantic salmon (mean length 7 cm) and 150 Senegalese sole (mean weight 2 g) fry were obtained from commercial fish farms and acclimatized for at least 7 days. Fish were maintained at a maximum density of 100 fish in 100 l aquaria with aeration and were fed *ad libitum* with a commercial diet. All animals were handled in strict accordance with good animal practices, as defined by the European Union guidelines for the handling of laboratory animals (directive 2010/63/UE). The protocol was

approved by the Galician Committee of Experimental Animal Welfare and the Xunta de Galicia (Permit ID 15004/13/002). All efforts were made to minimize animal suffering. Temperature, lighting and noise were strictly controlled in order to minimize stress. Prior to the experimental infections, 10 fish of each species were sacrificed with an overdose of the anaesthetic MS-222 (Sigma-Aldrich) and tested by RT-PCR and nested-PCR to rule out the presence of IPNV, viral nervous necrosis virus, viral hemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus.

For this assay, the F3–F6 fractions were used directly (no cell-culture propagation was applied before the *in vivo* assay). Fish were injected intramuscularly with 0.1 ml inoculum containing 10⁵ TCID₅₀ of the corresponding fraction or with L-15 medium (control group) and distributed into four groups (40 and 30 individuals per group, in the salmon and sole trials, respectively) named after the inoculated virus fraction (F3–F6). Fish were then maintained at 15 °C and mortalities were recorded daily for 40 days in the case of salmon, and for 30 days for infected sole. Dead fish were stored at –80 °C and subsequently used for virus analysis.

In the salmon experiments, due to the absence of mortality, a second virus injection was applied at 20 days p.i., and fish were sampled (five fish per fraction) at days 30, 33 and 35 p.i. (10, 13 and 15 days after the second infection) with the aim of monitoring virus replication. Surviving and sampled fish were killed by an MS-222 overdose.

Virus detection. From dead and surviving fish, the heart, kidney, spleen and head were sampled aseptically and pooled in sets of five fish. The samples were disrupted and the homogenates diluted 1 : 10 (w/v) in Earle's balanced salt solution supplemented with 1000 IU penicillin, 1000 µg ml⁻¹ streptomycin, 500 µg gentamicin ml⁻¹ and 10 µg amphotericin (Gibco) ml⁻¹. After centrifugation at 7500 g for 15 min at 4 °C, the supernatants were incubated overnight at 4 °C and then subjected to virus detection by isolation in cell culture, by RT-PCR plus nested-PCR, and by RT-qPCR.

For RT-PCR detection of IPNV, total RNA extraction was performed using an RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was carried out with the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). PCR and nested-PCR were carried out using the commercial kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega), using primers 5'-AGAGATCACTGACTTCACAGTGAC-3' (forward) and 5'-TGTGCACCACAGGAAAGATGACTC-3' (reverse) (Heppell *et al.*, 1992) for PCR, and 5'-AAAGCATGGGGCTGGAGAG-3' (forward; designed by our laboratory at position 1403 in the genome sequence of the Jasper strain, GenBank accession no. M18049) and 5'-TGTGCACCACAGGAAAGATGACTC-3' (reverse) for semi-nested PCR. Amplified DNA products were run in 2 % agarose gels and visualized with Red Safe (iNTRON Biotechnology).

For RT-qPCR detection of IPNV, the total RNA extracted previously as described above was subjected to cDNA synthesis as above. For qPCR amplification, segment B was targeted using primers 5'-CHGCCGGCCTACCNTACATAGG-3' (forward) and 5'-CCRCAGCTBAGRTACCAGAGTCCGG-3' (reverse) at positions 838 and 976 in the Jasper strain (GenBank accession no. M58756), employing a GoTaq PCR Master Mix kit (Promega) with SYBR Green I, as described by the manufacturer. The amplification was performed in a C1000 Thermal Cycler CFX96 RealTime System (Bio-Rad).

For virus isolation in cell culture, homogenate supernatants were diluted 1 : 10 and 1 : 100 in L-15 medium, and inoculated in duplicate on semi-confluent BF-2 monolayers grown in 48-well plates. Plates were maintained at 15 °C and visualized daily to detect cytopathic effect. After 10 days, a new passage was applied and after two positive passages, the presence of IPNV was confirmed by RT-PCR.

ACKNOWLEDGEMENTS

M. L. would like to thank the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia for the FPU grant with the reference AP2009-0720 (Dirección General de Investigación, MEC).

REFERENCES

- Beniac, D. R., Melito, P. L., Devarenes, S. L., Hiebert, S. L., Rabb, M. J., Lamboo, L. L., Jones, S. M. & Booth, T. F. (2012). The organisation of Ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS One* 7, e29608.
- Blake, S., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S. & Nicholson, B. L. (2001). Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis Aquat Organ* 45, 89–102.
- Bruslind, L. D. & Reno, P. W. (2000). Virulence comparison of three Buhl-subtype isolates of infectious pancreatic necrosis virus in brook trout fry. *J Aquat Anim Health* 12, 301–315.
- Cárdenas, C., Carmona, M., Gallardo, A., Labra, A. & Marshall, S. H. (2014). Coexistence in field samples of two variants of the infectious salmon anemia virus: a putative shift to pathogenicity. *PLoS One* 9, e87832.
- Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. & Steven, A. C. (1997). Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol* 138, 975–985.
- Chang, N., Macdonald, R. D. & Yamamoto, T. (1978). Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Can J Microbiol* 24, 19–27.
- Cohen, J., Poinard, A. & Scherrer, R. (1973). Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol* 21, 485–498.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6, 836–846.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Delmas, B. & Rey, F. A. (2010). Crystal structure of an aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism. *J Virol* 84, 1792–1799.
- Dobos, P. (1977). Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 21, 242–258.
- Dobos, P. (1995a). The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu Rev Fish Dis* 5, 25–54.
- Dobos, P. (1995b). Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 208, 19–25.
- Duncan, R., Nagy, E., Krell, P. J. & Dobos, P. (1987). Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J Virol* 61, 3655–3664.
- Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. A. & Dobos, P. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* 181, 541–552.
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P. (1991). An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185, 291–298.
- Heppell, J., Berthiaume, L., Tarrab, E., Lecomte, J. & Arella, M. (1992). Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J Gen Virol* 73, 2863–2870.
- Heppell, J., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L. & Arella, M. (1995). Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 214, 40–49.
- Hill, B. J. & Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu Rev Fish Dis* 5, 55–77.
- Kelly, R. K. & Loh, P. C. (1972). Electron microscopical and biochemical characterization of infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 10, 824–834.
- Kiley, M. P., Bowen, E. T. W., Eddy, G. A., Isaacs, M., Johnson, K. M., McCormick, J. B., Murphy, F. A., Pattyn, S. R., Peters, D. & other authors (1982). *Filoviridae*: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology* 18, 24–32.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lago, M., Crujeiras, A., Bandín, I. & Dopazo, C. (2013). Ex vivo reassortment between IPNV strains. In *16th International Conference on Diseases of Fish & Shellfish*, P-025. European Association of Fish Pathologists (EAFP) Tampere, Finland
- Lago, M., Bandín, I., Barja, J. L., Rodríguez, J. F. & Dopazo, C. P. (2010). Virulence for cultured turbot and Senegalese sole of aquatic birnaviruses from wild fish: analysis of factors of virulence. In *8th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates*, P11. 26–29 April, Santiago de Compostela, Spain
- Lightner, D. & Post, G. (1969). Morphological Characteristics of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Trout Pancreatic Tissue. *J Fish Res Board Can* 26, 2247–2250.
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Castón, J. R. (2009). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2148–2152.
- Magyar, G. & Dobos, P. (1994). Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* 204, 580–589.
- Moss, L. H. I., III & Gravel, M. (1969). Ultrastructure and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 3, 52–58.
- Pedersen, T., Skjesol, A. & Jørgensen, J. B. (2007). VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interacts with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA. *J Virol* 81, 6652–6663.
- Rager, M., Vongpunswad, S., Duprex, W. P. & Cattaneo, R. (2002). Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J* 21, 2364–2372.
- Reed, L. J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg* 27, 493–497.
- Romero-Brey, I., Bandín, I., Cutrín, J. M., Vakharia, V. N. & Dopazo, C. P. (2009). Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *J Fish Dis* 32, 585–595.
- Sano, M., Okamoto, N., Fukuda, H., Saneyoshi, M. & Sano, T. (1992). Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *J Fish Dis* 15, 283–293.
- Santi, N., Vakharia, V. N. & Evensen, Ø. (2004). Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322, 31–40.
- Santi, N., Sandtrø, A., Sindre, H., Song, H., Hong, J. R., Thu, B., Wu, J. L., Vakharia, V. N. & Evensen, Ø. (2005). Infectious

pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. *Virology* **342**, 13–25.

Schrauwen, E. J., de Graaf, M., Herfst, S., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. (2014). Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**, 479–490.

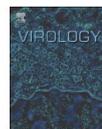
Shivappa, R. B., Song, H., Yao, K., Aas-Eng, A., Evensen, O. & Vakharia, V. N. (2004). Molecular characterization of Sp serotype

strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis Aquat Organ* **61**, 23–32.

Song, H., Santi, N., Evensen, O. & Vakharia, V. N. (2005). Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *J Virol* **79**, 10289–10299.

Vestergård Jorgensen, P. & Grauballe, P. C. (1971). Problems in the serological typing of IPN virus. *Acta Vet Scand* **12**, 145–147.





In vitro reassortment between Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) strains: The mechanisms involved and its effect on virulence

María Lago, Isabel Bandín, José G. Oliveira, Carlos P. Dopazo*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura-Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15706, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:
IPNV
Reassortment
Virulence

ABSTRACT

Reassortment is one of the main mechanisms of evolution in dsRNA viruses with segmented genomes. It contributes to generate genetic diversity and plays an important role in the emergence and spread of new strains with altered virulence. Natural reassortment has been demonstrated among infectious pancreatic necrosis-like viruses (genus *Aquabirnavirus*, *Birnaviridae*). In the present study, coinfections between different viral strains, and genome sequencing by the Sanger and Illumina methods were applied to analyze the frequency of reassortment of this virus *in vitro*, the possible mechanisms involved, and its effect on virulence. Results have demonstrated that reassortment is a cell-dependent and non-random process, probably through differential expression of the different mRNA classes in the ribosomes of a specific cell, and by specific associations between the components to construct the ribonucleoprotein (RNP) complexes and/or RNP cross-inhibition. However, the precise mechanisms involved, known in other viruses, still remain to be demonstrated in birnaviruses.

1. Introduction

Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), a member of the genus *Aquabirnavirus* (family *Birnaviridae*), is the etiological agent of a highly contagious disease that causes high mortalities, especially in young farmed salmonids. This disease is endemic in different areas and the virus has been isolated from a wide range of fish species.

IPNV is a non-enveloped icosahedral virus, with a bi-segmented dsRNA (Lightner and Post, 1969; Cohen et al., 1973; Dobos, 1977). Segment A contains two partially overlapping open reading frames (ORFs): the smaller one is located at the 5' end and encodes the VP5 protein (Duncan et al., 1987; Magyar and Dobos, 1994; Dobos, 1995a), and the larger encodes a polyprotein, which is processed by the protease activity of VP4, yielding VP2, VP3 and VP4. VP2 is the major structural protein and is related to virulence (Heppell et al., 1995; Blake et al., 2001; Santi et al., 2004). VP3 is involved in virus assembly and genome packaging (Pedersen et al., 2007). Segment B contains only one ORF that encodes VP1, the viral polymerase (Duncan et al., 1991; Dobos, 1995b).

The high diversity (both genomic and antigenic) of this viral group is well known, and it has been recently demonstrated to be even higher due to the existence of natural reassortment. Reassortants were first reported by Romero-Brey et al. (2009) when analyzing the genomic diversity of aquabirnavirus isolates among natural fish populations from the Flemish Cap. Since then, a large number of reassortant strains

have been detected in different locations (Cutrin et al., 2010; Lago et al., 2014; Moreno et al., 2014). This phenomenon has also been reported in infectious bursal disease virus (IBDV), a virus of another genus of the *Birnaviridae* family (g. *Avibirnavirus*) (Wei et al., 2008; Ksanga et al., 2013; Lu et al., 2015), and is also known in viruses from other viral groups, such as hantavirus, Lassa virus and tenuiviruses, with low rates of reassortment, and cystoviruses, rotavirus A and influenza A virus, with higher rates (Simon-Lorriere and Holmes, 2011).

Reassortment is one of the main mechanisms of evolution in dsRNA viruses (Wei et al., 2006) and, together with sequential point mutations and recombination, is one of the key factors shaping the structure of genes and genomes, which contributes to genetic diversity (Devold et al., 2006). Replication of the two variants of a virus in the same target cell leads to the exchange of the genomic RNA segments and generates new reassortant strains. Two possible mechanisms of reassortment have been suggested: a random incorporation of segments during the replication cycle, and a selective incorporation which requires genomic signals (Pérez-Losada et al., 2014). Although, the mechanisms of reassortment still remain partially unknown, evidence exists supporting the second hypothesis.

It has been postulated that reassortment facilitates cross-species transmission and allows viruses to acquire new antigenic combinations that may assist in the process of entering a new host (Pérez-Losada et al., 2014). Furthermore, it plays an important role in the emergence and spread of new strains with altered antigenicity and/or pathogeni-

* Corresponding author.

E-mail addresses: mariaidcarmen.lago@usc.es (M. Lago), isabel.bandin@usc.es (I. Bandín), jose.oliveira@usc.es (J.G. Oliveira), carlos.pereira@usc.es (C.P. Dopazo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.003>

Received 17 April 2016; Received in revised form 23 October 2016; Accepted 3 November 2016

Available online 10 November 2016

0042-6822/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

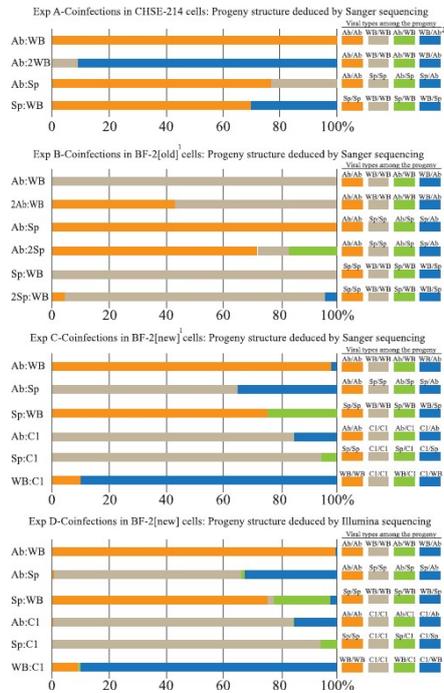


Fig. 1. Distribution of viral types among the progeny after coinfection with 2 IPNV strains: Cell cultures were coinfecting with two parental types and, after total destruction of the monolayer, the crude virus was subjected to i) cloning by serial dilutions to sequence each clone (both segments) to determine the frequency of types among the progeny (experiments A to C; Sanger sequencing), or ii) sequencing by next generation sequencing (by the Illumina technology; experiment D). Coinfections were performed at ratios 1:1 (e.g. Ab:WB), 1:2 (e.g. Ab:2WB) or 2:1 (e.g. 2WB:Ab). 1- BF-2[old]: a cell line clone with more than 200 passages; BF-2[new]: new clone from the European Cell Culture Collection (ECACC). 2- Type of viral genome: Segment A/Segment B.

city (Ramig, 1997; Ohashi et al., 2004; Nikolakaki et al., 2005), and in the appearance of new phenotypes after the reassortment between a high pathogenic and an avirulent strain (Le Nouén et al., 2006; Wei et al., 2008; Kirsanovs et al., 2010; Coetzee et al., 2014; Park et al., 2014).

The implication of reassortment in the modulation of the virulence in aquaribnavirus was previously suggested by our group (Lago et al., 2010, 2013). In the present study, we have analyzed the frequency of reassortment in *in vitro* conditions, the possible mechanisms involved, and its effect on the virulence of the progeny.

2. Results

2.1. Reassortment in vitro

The results of the 4 sets of co-infection experiments are shown in Fig. 1 and Supplementary Table 1. In the co-infections performed in CHSE-214 at ratio 1:1, reassortment was achieved only when the wild

types Sp and WB were used, obtaining 70% of clones of the type Sp and 30% of the reassortant WB/Sp. Co-infection between the Ab and Sp types yielded a progeny composed exclusively of the wild types: 77% of Ab and 23% of Sp; this coinfection was repeated ones, yielding similar results: 81% of Ab and 19% of Sp (results not shown in Fig. 1). The progeny from co-infection Ab:WB was exclusively constituted by the wild type Ab in a first assay (Fig. 1), and also in the second run (results not shown). When this co-infection was repeated at a ratio 1:2 (Ab/2WB), the wild type Ab disappeared from the progeny, and most of this (91%) was constituted by the reassortant WB/Ab, completed with a low percentage (9%) of the second wild type (WB).

In a second set of experiments, performed in BF-2[old] cells (viral clones sequenced by the Sanger method), reassortants were not detected among the progeny of co-infections performed at a ratio 1:1. Both 1:1 co-infections with the wild type WB (Ab:WB and Sp:WB) yielded progenies exclusively constituted by the WB type, and only the Sp type was detected in the co-infection Ab:Sp. Changing the ratio of the co-infection with Ab and WB to 2:1 (2Ab:WB), in order to favour the presumably less productive type, the percentage of WB among the progeny was reduced to 57%, and the type Ab represented 43%, but no reassortants could be detected. At a ratio 1:2, the co-infection with Ab and Sp (Ab:2Sp) yielded a progeny mostly constituted by the wild type Ab (as with ratio 1:1), but the percentage was reduced to 72%; the second wild type represented 11%, and 17% was constituted by the reassortant Ab/Sp. Most of the clones of the progeny from co-infection 2Sp:WB was of the WB type (92%); 4% was of the wild type Sp, and a reassortant WB/Sp was also represented 4%.

The co-infection assays performed at ratio 1:1 were repeated in the new cell line (BF-2[new] cells) in two sets of experiments (C and D) sequenced by the Sanger and Illumina methods, respectively. In both cases, more reassortants were detected, but it is remarkable that using the Illumina method, more types of virus were observed, and more reassortants detected. Since this method provides just the percentage of each type of segment present in the progeny, an algorithm [Supplementary File 1] had to be designed to predict the corresponding putative combinations of each type of virus, yielding a range of percentages, instead of single values. The co-infection Ab:WB yielded a progeny constituted almost exclusively by the wild type Ab (98% with Sanger and 99.6–99.6% with Illumina); a reassortant WB/Ab was hardly represented (2% and below 0.4%, respectively), and the presence of the other 2 types (WB/WB and Ab/WB) was negligible ($\leq 0.01\%$ with Illumina). Both co-infections with the Sp wild type yielded progenies with a majority of the Sp type; in the co-infection Ab:Sp, the reassortant Sp/Ab represented around 32–35% (35 with Sanger and 32–33% with Illumina), and the other 2 types (Ab/Sp and Ab) below 1.2% with Illumina (not detected by Sanger); in the co-infection Sp:WB, a reassortant Sp/WB represented between 19% and 24% (24%, Sanger; 19.4–22.2%, Illumina) of the progeny, and the presence of the other 2 types (WB/Sp and WB) was below 2.8% with Illumina (not detected by Sanger).

In both sets of experiments, a fourth reference strain was assayed against the other 3. When C1 was co-infecting with Ab or Sp, most of the progeny (around 84% and 94%, respectively) was constituted by the wild type C1; in the progeny from co-infection Ab:C1, a reassortant C1/Ab was present at around 15%, and the representation of the other 2 types was not detected by Sanger and negligible (below 0.7%) by Illumina; in the co-infection Sp:C1, only a second viral type was detected -the reassortant Sp/C1-, at around 5% by both sequencing methods. Interestingly, the co-infection WB:C1 yielded a progeny mostly constituted by the reassortant C1/WB (around 90%); the wild type C1 was absent or negligible and the WB type was poorly represented (around 9–10%).

2.2. Statistical analysis

Table 1 shows the statistical analysis performed to determine if bias

Table 1

Statistical analysis of segment types distributions among the progeny: is there a significant bias in terms of individual segments to be more likely to reassort than others? The observed distribution of RNA segments types in the progeny have been compared by a χ^2 test with the expected distribution in a random synthesis and packaging model (50% of each type for each segment). H_0 : no differences between both distributions (Segments from both parents are randomly distributed). The data are given as percentage of each type.

Coinfection	Segment A	Segment B	P	Interpretation
Exp A: Sanger in CHSE				
Ab:WB	Ab WB	Ab WB	WB	WB
	100 0	100 0	0	<0.0001 Non-random
Ab:2WB	Ab WB	Ab WB	WB	WB
	0 100	91 9	9	<0.0001 Non-random
Ab:Sp	Ab Sp	Ab Sp	WB	WB
	77 23	77 23	23	<0.0001 Non-random
Sp:WB	Sp WB	Sp WB	WB	WB
	70 30	100 0	0	<0.0001 Non-random
Exp B: Sanger in BF-2[old]				
Ab:WB	Ab WB	Ab WB	WB	WB
	0 100	0 100	100	<0.0001 Non-random
2Ab:WB	Ab WB	Ab WB	WB	WB
	43 57	43 57	57	H_0 (random) cannot be rejected
Ab:Sp	Ab Sp	Ab Sp	WB	WB
	100 0	100 0	0	<0.0001 Non-random
Ab:2Sp	Ab Sp	Ab Sp	WB	WB
	89 11	72 28	28	<0.0001 Non-random
Sp:WB	Sp WB	Sp WB	WB	WB
	0 100	0 100	100	<0.0001 Non-random
2Sp:WB	Sp WB	Sp WB	WB	WB
	4 96	8 92	92	<0.0001 Non-random
Exp C: Sanger in BF-2[new]				
Ab:WB	Ab WB	Ab WB	WB	WB
	98 2	100 0	0	<0.0001 Non-random
Ab:Sp	Ab Sp	Ab Sp	WB	WB
	0 100	35 65	65	<0.0001 Non-random
Sp:WB	Sp WB	Sp WB	WB	WB
	100 0	76 24	24	<0.0001 Non-random
Ab:C1	Ab C1	Ab C1	C1	C1
	0 100	15 85	85	<0.0001 Non-random
Sp:C1	Sp C1	Sp C1	C1	C1
	5 95	0 100	100	<0.0001 Non-random
WB:C1	WB C1	WB C1	C1	C1
	10 90	100 0	0	<0.0001 Non-random
Exp D MiSeq in BF-2[new]				
Ab:WB	Ab WB	Ab WB	WB	WB
	99.62 0.38	99.99 0.01	0.01	<0.0001 Non-random
Ab:Sp	Ab Sp	Ab Sp	WB	WB
	1.16 98.84	31.58 68.41	68.41	<0.0001 Non-random
Sp:WB	Sp WB	Sp WB	WB	WB
	97.17 2.83	77.84 22.16	22.16	<0.0001 Non-random
Ab:C1	Ab C1	Ab C1	C1	C1
	0.68 99.32	15.37 84.63	84.63	<0.0001 Non-random
Sp:C1	Sp C1	Sp C1	C1	C1
	5.67 94.33	0 100	100	<0.0001 Non-random
WB:C1	WB C1	WB C1	C1	C1
	9.36 90.64	99.63 0.37	0.37	<0.0001 Non-random

occurs at the level of individual segments. For that purpose, the percentages of each type of both segments present among the progeny were deduced from the distribution of viral types revealed by Sanger sequencing (the sequencing of cloned virus ensures that only packaged segments are considered). The observed data were compared by χ^2 with the expected distribution for a random reassortment: i) 50:50/50:50 (50% of segment A type 1:50 sgm A type 2/50% sgm B type 1:50 sgm B type 2) for coinfections 1:1; ii) 40:60/40:60 for coinfections 1:2; iii) 60:40/60:40 for coinfections 2:1. As shown in Table 1, in most cases

the observed distributions showed percentage values clearly distinct from the expected values for a random process ($p < 0.0001$).

On the other hand, the Illumina sequencing of total RNA extracted from crude virus from a completely lysed monolayer allows us to consider that i) most RNA is viral, and ii) all synthesized (packaged or not) viral RNA is included in the distribution. Therefore, to know if the synthesis of viral RNA followed a random distribution, the observed values in experiment D were compared with the expected one (50:50/50:50) and, as shown in Table 2, the differences were significant ($p < 0.0001$) in all cases.

To determine if certain association between both segments could exist, thus affecting reassortment, the approach by Lubeck et al. (1979) was applied (Table 2). Briefly, segment types frequencies deduced from the viral distributions observed in experiments A to C were used to calculate the expected distributions of viral types in a random process (from the product between the frequencies of both segments combined in each viral type), and the observed and expected distributions were compared by a χ^2 test, understanding H_0 (no differences between both distributions) as a random segregation compatible with absence of segments association. As shown in Table 3, in the 3 experiments certain coinfections (1 in exp A, half in exp B and all in C) yielded a segment type distribution characterized by the absence of 1 or 2 types. As we demonstrate in the Supplementary File 2, in those cases the expected viral frequencies are necessarily equal to the observed ones and, therefore, the Lubeck approach cannot be applied. In all the remaining coinfections, the null hypothesis was rejected ($p < 0.0001$).

An important difference between experiments C and D is that whereas in exp D all segments –packaged and not packaged– are sequenced, in exp C only packaged segments are counted. Therefore, in order to determine if the packaging could affect the final result of reassortment (affecting to the final viral types distribution among the progeny), the segment and viral types frequencies observed in experiments C and D were compared by the χ^2 test, considering H_0 (no differences between both distributions) as demonstrative of no specific genome types selection during packaging. As shown in Table 3, in both cases, analyzing segment and viral distributions, the null hypothesis could not be rejected ($p > 0.05$).

Finally, the results of each coinfection (revealed by Sanger sequencing) were compared among cell lines, revealing significant differences in all cases ($p < 0.0001$), except between CHSE-214 and BF-2[new] cells with the coinfection Ab:WB ($p=0.7968$ or $p=0.5102$, depending on which of both sets was used as the expected distribution (Supplementary Table 2).

2.3. Differential infectivity in vitro

To study the implication of reassortment, as well as of the type of each genome segment, on the efficiency of the replication of the virus, wild type (WB, Sp and Ab) and reassortant (WB/Ab, WB/Sp and Ab/Sp) clones obtained from the first 2 experiments were inoculated in the same cell line they were obtained from (CHSE-214; except reassortant Ab/Sp, which was obtained from and assayed in BF-2). The ratios of viral adsorption and production were calculated, and the results are shown in Table 4. The 3 wild type strains, as well as the reassortant Ab/Sp, showed adsorption rates around 75% or higher. Only both reassortants with segment A of the WB type showed relatively low adsorption efficiencies (around 50% or lower). Although the viral titers were high in all cases (in the range 10^8 – 10^9 TCID₅₀/ml), differences among the clones could be observed when the efficiency of the replication was evaluated by analyzing the production rates (i.e., the ratio of viral particles produced in the progeny from each parental one, calculated as the ratio between the viral titers after CPE and the fixed virus). To this regard, the clones with segment B of the Sp type (the wild type Sp and the reassortants WB/Sp and Ab/Sp) showed the lowest rates of production (under 15,000 progeny/parental [pg/pr] virus). The wild types WB and Ab, and the reassortant WB/Ab, yielded

Table 2

Statistical analysis on viral types distribution among the progeny: Does exist a certain specific association or even linkage between both segments?. In application of the approach by Lubbeck et al. (1979), the observed frequencies of RNA segments types in the progeny have been used to calculate the expected distribution of viral types in a random reassortment process (from the product of the frequencies of both individual segments combined in each specific viral type); the observed and expected distributions were compared by a χ^2 test. H_0 : no differences between both distributions (No association between segment exists). The data are given as percentage of each type. 1.- When necessary, zero values were approximated to 1, to allow chi comparison. *, when one segment type is not represented, χ^2 cannot be applied (see Supplementary Fig. 1).

Coinfection	Observed viral types ¹		Segment Frequencies								Expected viral types				p	Interpretation
			Segm A				Segm B									
Exp A: Sanger in CHSE																
Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		*	χ^2 not applicable	
	100	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0			See Supplementary Fig. 1	
Ab:2WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		*	χ^2 not applicable	
	0	0	91	9	0	100	91	9	0	0	91	9			See Supplementary Fig. 1	
Ab:Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		<0.0001	Non-random	
	77	0	0	23	77	23	77	23	59,29	17,71	17,71	5,29			χ^2 not applicable	
Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		*	See Supplementary Fig. 1	
	70	0	30	0	70	30	100	0	70	0	30	0				
Exp B Sanger in BF-2[old]																
Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		*	χ^2 not applicable	
	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	100			See Supplementary Fig. 1	
2Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		<0.0001	Non-random	
	43	0	0	57	43	57	43	57	18,49	24,51	24,51	32,49			χ^2 not applicable	
Ab:Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		*	See Supplementary Fig. 1	
	100	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0				
Ab:2Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		<0.0001	Non-random	
	72	17	0	11	89	11	72	28	64,08	24,92	7,92	3,08			χ^2 not applicable	
Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		*	See Supplementary Fig. 1	
	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	100				
2Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		0.0007	Non-random	
	4	0	4	92	4	96	8	92	0,32	3,68	7,68	88,32				
Exp C Sanger in BF-2[new]																
Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB		*	χ^2 not applicable	
	98	0	2	0	98	2	100	0	98	0	2	0			See Supplementary Fig. 1	
Ab:Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp		*	χ^2 not applicable	
	0	0	35	65	0	100	35	65	0	0	35	65			See Supplementary Fig. 1	
Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB		*	χ^2 not applicable	
	76	24	0	0	100	0	76	24	76	24	0	0			See Supplementary Fig. 1	
Ab:C1	Ab/Ab	Ab/C1	C1/Ab	C1/C1	Ab	C1	Ab	C1	Ab/Ab	Ab/C1	C1/Ab	C1/C1		*	χ^2 not applicable	
	0	0	15	85	0	100	15	85	0	0	15	85			See Supplementary Fig. 1	
Sp:C1	Sp/Sp	Sp/C1	C1/Sp	C1/C1	Sp	C1	Sp	C1	Sp/Sp	Sp/C1	C1/Sp	C1/C1		*	χ^2 not applicable	
	0	5	0	95	5	95	0	100	0	5	0	95			See Supplementary Fig. 1	
WB:C1	WB/WB	WB/C1	C1/WB	C1/C1	WB	C1	WB	C1	WB/WB	WB/C1	C1/WB	C1/C1		*	χ^2 not applicable	
	10	0	90	0	10	90	100	0	10	0	90	0			See Supplementary Fig. 1	

the highest values in CHSE-214 (close to 50,000 pg/pr or higher). It is remarkable that the Sp type strain showed the highest adsorption capacity (over 90%) but the lowest production rate (342 and 494 pg/pr, in CHSE-214 and BF-2 cells, respectively). The calculated relative ratios shown in Table 2 allow us to compare the efficiency of replication of the different viral clones, which follow the sequence: WB/Ab > WB > Ab > Sp/Ab > WB/Sp > Sp, with ratio values of 526 ×, 360 ×, 131 ×, 42 ×, 17 × and 1 ×, respectively. Although the values changed considering the ratios of the parental viruses in BF-2 cells, the sequence of ratios is maintained.

2.4. Differential virulence in vivo

2.4.1. Challenges I

Two fish species have been challenged with the same viral clones used for the *in vitro* assays, and the results are shown in Fig. 2. In sole, no mortalities were produced by the wild types WB and Sp, or by the reassortant WB/Sp, and only a 3% cumulative mortality by the WB/Ab reassortant. Clones Ab and Ab/Sp started to produce mortalities in sole tanks at days 11 and 13, respectively, and reached a total cumulative mortality of 30% around 30 d p.i. We must point out that, although in general no clinical signs of disease were observed, some fish inoculated with Ab showed abnormal swimming and anorexia.

In salmon, the wild type WB and the reassortants Ab/Sp and WB/

Sp did not produce any mortality. Clones Sp and WB/Ab produced cumulative mortalities of 16% and 18%, respectively. Interestingly, the curve obtained with the wild type Ab was completely different, reaching 100% mortality at day 28. The fish challenged with this viral clone showed the typical dark pigmentation, exoftalmia and abnormal swimming. These symptoms were also observed in some of the fish infected with Sp.

Viruses was detected by RT-PCR and nested-PCR and reisolated from all infected fish of both species.

2.4.2. Challenges II

For comparative purposes, 3 viral isolates of the same type as the clones (wild type WB [isolate 19G4] and Ab [20G3], and the reassortant WB/Ab [20G7]) were also tested in challenges with sole and salmon fry. As shown in Fig. 3, the mortalities produced by these isolates were much higher than those by the corresponding clone in most cases. In sole, mortalities started 1 d p.i. with the WB type (19G4), and day 4 with 20G7 and 20G3, reaching total cumulative mortalities of 96.7% and 90% with the wild types Ab and WB (respectively), and lower (79%) with the reassortant 20G7 isolate. Mortalities were higher in salmon: 100% with the wild types Ab and WB, and again lower with the reassortant (88.9%), and started at day 1 (20G3) or day 3 p.i. (19G4 and 20G7).

Table 3

Statistical analysis to compare experiments C and D: Does packaging affect the final result of reassortment? Segment types (A) and viral types (B) frequencies observed in experiments C and D were compared by a χ^2 test (H_0 : no differences between both distributions). The data are given as percentage of each type. When necessary, zero values were approximated to 1 to allow chi comparison.

A/ Comparison of segment types frequencies										
Observed segment type frequency (exp C)					Expected segment type frequency (exp D)				P	Interpretation
Segment A		Segment B			Segment A		Segment B			
Ab:WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab	WB	Ab	WB	0,0737	H_0 (random) cannot be rejected
	98	2	100	0	99,62	0,38	99,99	0,01		
Ab:Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	Ab	Sp	0,6336	H_0 (random) cannot be rejected
	0	100	35	65	1,16	98,84	15,62	31,58		
Sp:WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp	WB	Sp	WB	0,3752	H_0 (random) cannot be rejected
	100	0	76	24	97,17	2,83	77,84	22,16		
Ab:C1	Ab	C1	Ab	C1	Ab	C1	Ab	C1	0,8743	H_0 (random) cannot be rejected
	0	100	15	85	0,68	99,32	15,37	84,63		
Sp:C1	Sp	C1	Sp	C1	Sp	C1	Sp	C1	0,9926	H_0 (random) cannot be rejected
	5	95	0	100	5,67	94,33	0	100		
WB:C1	WB	C1	WB	C1	WB	C1	WB	C1	0,9362	H_0 (random) cannot be rejected
	10	90	100	0	9,36	90,64	99,63	0,37		

B/ Comparison of viral types frequencies										
Observed viral type frequency					Expected viral type frequency				P	Interpretation
Segment A		Segment B			Segment A		Segment B			
Ab:WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	Ab/Ab	Ab/WB	WB/Ab	WB/WB	0,5638	H_0 (random) cannot be rejected
	98	0	2	0	99,6	0	0,4	0		
Ab:Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	Ab/Ab	Ab/Sp	Sp/Ab	Sp/Sp	0,5132	H_0 (random) cannot be rejected
	0	0	35	65	1	32	66	66		
Sp:WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	Sp/Sp	Sp/WB	WB/Sp	WB/WB	0,1870	H_0 (random) cannot be rejected
	76	24	0	0	76	20	2	2		
Ab:C1	Ab/Ab	Ab/C1	C1/Ab	C1/C1	Ab/Ab	Ab/C1	C1/Ab	C1/C1	0,5553	H_0 (random) cannot be rejected
	0	0	15	85	0,5	15	84	84		
Sp:C1	Sp/Sp	Sp/C1	C1/Sp	C1/C1	Sp/Sp	Sp/C1	C1/Sp	C1/C1	0,5635	H_0 (random) cannot be rejected
	0	5	0	95	0	5,7	0	94,3		
WB:C1	WB/WB	WB/C1	C1/WB	C1/C1	WB/WB	WB/C1	C1/WB	C1/C1	0,5474	H_0 (random) cannot be rejected
	10	0	90	0	9	0,4	90,2	0,4		

3. Discussion

Genetic reassortment is a common feature of segmented viruses which, through coinfection in a host, allow them to exchange and combine characteristics between different strains and types of a virus, introducing important genomic and phenotypic changes. This process provides viruses with high levels of adaptation to new environments and hosts, and modulates their virulence (Wei et al., 2006; Greenbaum

et al., 2011; Pérez-Losada et al., 2014). In fish viruses, it has been described in infectious salmon anaemia virus (ISAV) (Plarre et al., 2012) and betanodavirus (Tofolo et al., 2007; Oliveira et al., 2009), as well as in aquabirnaviruses (Romero-Brey et al., 2009; Bandin et al., 2014; Moreno et al., 2014). In IBDV, another virus of the family *Birnaviridae*, natural reassortment has been reported to play an important role in the emergence of highly virulent strains (Yamaguchi et al., 1997; Hon et al., 2006) and to represent a

Table 4

Differential replication *in vitro*.- Efficacy of the replication in cell culture of the wild type and reassortant clones.

Clone	Cell line	Inoculum ³		Adsorbed virus ⁴		Viral production ⁵				
		TCID ₅₀ /ml ¹	Log ± sdev ²	TCID ₅₀ /ml	Log ± sdev	Adsorp. (%) ⁶	TCID ₅₀ /ml	Log ± sdev	Prod rate ⁷	Ratio ⁸
WB/WB	CHSE-214	9.63×10 ³	3.98 ± 0.29	7.16×10 ³	3.85 ± 0.27	74.4	8.82×10 ⁸	8.95 ± 0.38	1.23×10 ⁵	360
	BF-2	3.21×10 ⁴	4.51 ± 0.36	2.49×10 ⁴	4.40 ± 0.37	77.4	1.61×10 ⁹	9.21 ± 0.25	6.50×10 ⁴	132*
Ab/Ab	CHSE--214	2.23×10 ⁴	4.35 ± 0.14	1.91×10 ⁴	4.28 ± 0.33	85.7	8.57×10 ⁸	8.93 ± 0.41	4.49×10 ⁴	131
	BF-2	2.86×10 ⁴	4.46 ± 0.32	2.56×10 ⁴	4.41 ± 0.31	89.6	7.74×10 ⁸	8.89 ± 0.06	3.02×10 ⁴	61*
Sp/Sp	CHSE-214	4.38 ×10 ⁵	5.64 ± 0.17	4.01×10 ⁵	5.60 ± 0.24	91.6	1.37×10 ⁸	8.14 ± 0.29	3.42×10 ²	1
	BF-2	5.22×10 ⁵	5.72 ± 0.22	4.87×10 ⁵	5.69 ± 0.23	93.3	2.40×10 ⁸	8.38 ± 0.36	4.94×10 ²	1*
WB/Ab	CHSE-214	3.97×10 ³	3.60 ± 0.14	2.20×10 ³	3.34 ± 0.19	55.4	3.97×10 ⁸	8.60 ± 0.14	1.80×10 ⁵	526
	WB/Sp	5.50×10 ³	4.74 ± 0.29	2.34×10 ⁴	4.37 ± 0.39	42.5	1.17×10 ⁸	8.07 ± 0.45	5.85×10 ³	17
Sp/Ab	BF-2	2.29×10 ⁵	5.36 ± 0.43	1.85×10 ⁵	5.27 ± 0.52	80.8	2.64×10 ⁹	9.56 ± 0.50	1.43×10 ⁴	42 (32*)

The results are expressed as average TCID₅₀/ml (1) (from 6 replicas) and average Log₁₀ (TCID₅₀/ml) ± standard deviation (2) of the inoculated (3), adsorbed (4) and replicated (5; after CPE) virus. The efficiency of the adsorption (6; as percentage) was calculated from the ratio between adsorbed and total viral inoculum. The production rate (7), or the number of virus produced in the progeny per each parental virus, was calculated as the ratio between produced and fixed virus. The relative ratio of production (8) was calculated as the ratio between the production rate of each virus and the lowest value of production rate observed (that of the Sp type); the ratio values labelled with a "*" were calculated among the parental virus production rates in BF-2 cells.

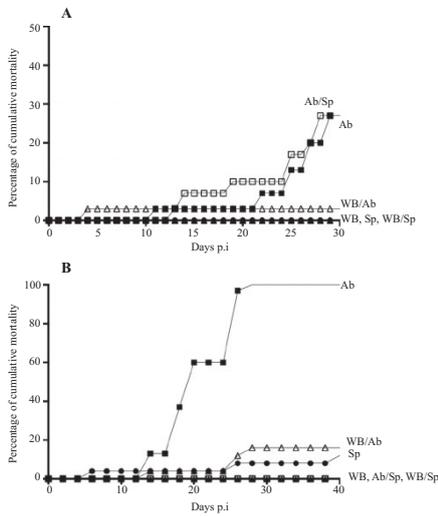


Fig. 2. *In vivo* differential infectivity of viral clones from the progeny of coinfection experiments: The curves represent the cumulative mortality (expressed as percentage) of sole, *Solea senegalensis* (A), and salmon, *Salmo salar* (B), fry challenged with clones Ab/Sp (white square), Ab (black square), WB/Ab (white triangle) and WB (black triangle).

demonstrated risk of generating uncontrolled chimera viruses throughout reassortment with live attenuated vaccine viruses (Wei et al., 2008; Kasanga et al., 2013). In IPNV the mechanism involved and its implication in virulence had not been studied to date; therefore, we designed *in vitro* and *in vivo* experiments with different reference strains, in order to have a better understanding of reassortment in these viruses.

In the *in vitro* assays, our interest was to analyze the reassortment patterns in the two cell lines most commonly used for the propagation of that virus: CHSE-214 and BF-2. In addition, since in the first assays the results in both cell lines were so dissimilar, we suspected that something had gone wrong with the assays. After testing different possibilities, we realized that the BF-2 cell line used was a very old clone (BF-2[old]). Therefore, a new clone was purchased and the coinfection assays were repeated. Furthermore, in order to ensure the detection of any type that was poorly represented in the progeny population, the Illumina sequencing procedure was also applied, and the results compared with those by the Sanger method in the same cell line.

Although reassortment is well documented to be a non-random process in other viruses (McDonald et al., 2009; Baker et al., 2014; Nomikou et al., 2015), until now it remained unknown in IPNV. If reassortment was random in this virus, we expected to obtain a balanced distribution of viral types among the progeny (25% of each of the 4 types: 2 parental types and 2 reassortants). However, in the present study the observed distributions were in all cases clearly different ($p < 0.0001$) from the expected one, confirming that reassortment is also non-random in aquabirnaviruses. The fact that certain reassortants are more represented among the progeny than expected by chance may be due to a higher production of certain segment types, due to a certain association (or even) linkage between segments, or

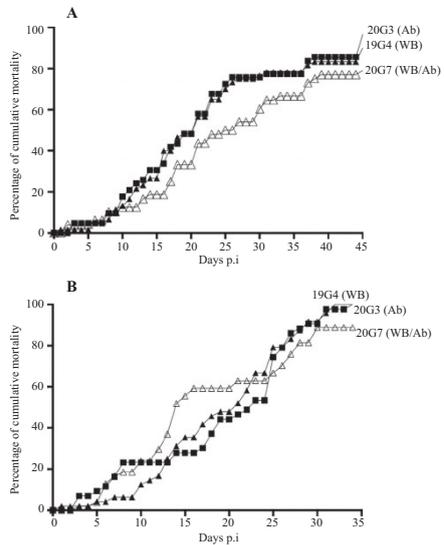


Fig. 3. *In vivo* differential infectivity of reassortant and wild type isolates: The curves represent the cumulative mortality (expressed as percentage) of sole, *Solea senegalensis* (A), and salmon, *Salmo salar* (B), fry challenged with isolates 20G3 (Ab type; black square), 19G4 (WB type; black triangle) and 20G7 (WB/Ab type; white triangle).

even by selective packaging. The analysis of the results from the *in vitro* assays were performed to answer to the question of which of those possibilities were involved in the non-random reassortment of IPNV.

First, the analysis of the segment frequencies obtained in our study (Table 2) demonstrated that the bias in individual segments frequencies could not be explained by a random process, then indicating that certain segment types are more efficient in their replication, or that they are favoured by selection due to cell-dependent factors. Second, although the Lubeck approach could only be applied to part of the viral progeny distributions observed (Table 3), in those cases significant differences were observed with respect to the expected distribution, thus demonstrating that a certain association between both segments must exist; in fact, it seems that in general the combinations between homologous segments are favoured against the heterologous ones. However, the comparison of results from experiments C and D indicates that the packaging of the genomes is random, thus indicating that this step does not influence the result of reassortment.

Before getting into the IPNV replication steps that make reassortment be non-random in these viruses, their mechanism of replication must be summarized. In birnaviruses, VP1 (the viral RNA-dependent RNA polymerase [RdRp]) is present in the virion in two molecular forms: as a soluble protein and covalently linked to the 5' end of both genome segments in a ribonucleoprotein (RNP) complex (Calvert et al., 1991; Muller and Nitschke, 1987). During the viral replication, VP1 and VP3 interact with each other and with the viral segments to form the RNP complex, and the association of VP3 seems to activate the viral RdRp (Ferrero et al., 2015; Pedersen et al., 2007; Tacken et al., 2002); this implies that RNA synthesis depends on the formation of the RNP complexes. After the RNA synthesis, VP3 acts as a scaffolding element during assembly, interacting with VP2 to construct the capsid (Bahar

et al., 2013; Lombardo et al., 1999; Maraver et al., 2003).

There are three events during the replication cycle that could be involved in a non-random reassortment:

i) Transcription/replication.- If the transcription and/or replication efficiency of one of the genomes in a coinfection is higher than the other, it would be understandable to obtain a non-random composition of the progeny. The efficiency of transcription/replication may depend on the polymerase and/or the specific ribonucleoprotein (RNP) complex (Wong et al., 2011). Considering this, the composition of the progeny would therefore be cell-independent; however, although in one case –the coinfection Ab:WB in CHSE-214 and BF-2[new]– the distribution of segment types in the progeny seemed to be cell-independent (no significant [$p > 0.05$] differences between both), in most cases it actually was cell-dependent ($p < 0.0001$). This agrees with the observation for influenza virus that host factors may regulate or enhance viral RNA transcription and replication in infected cells (Jorba et al., 2008; Nagata et al., 2008). On the other hand, if a distribution of types among the progeny depended exclusively on its capacity of replication in the cells, it would be expected to observe higher percentages of those types with higher productivity on the replication assays, but this was not observed. Therefore, the efficiency of the replication alone cannot explain all the results of the progeny composition yielded by the coinfection assays.

ii) Translation.- Different *ribosome restriction sites* in the mRNA may be responsible for differences in the affinity to specific ribosomes, and thus the mRNA of different viral types might be expressed at different levels. The mRNA may also form secondary and tertiary tridimensional structures (sequence-dependent), which may play an important role in regulating the level of expression of a specific mRNA in the ribosomes of a specific cell type. Furthermore, in IBDV a *cell initiation factor* has been demonstrated to interact with VP1, and this association plays an important role in initiating translation (Tacken et al., 2004). These facts could explain a cell-dependent variability of the level of expression of a specific mRNA.

Segments from different viral types would have different levels of expression and would, thereby, yield different quantities of the protein units required to construct new RNP complexes. For some viruses, including IBDV, it has been reported that the probability to construct RNPs with homologous units is higher than that with the heterologous ones (Tacken et al., 2000; McDonald et al., 2009; Hara et al., 2013; Baker et al., 2014), and it is tempting to assume –based on our results– that it could be the same for IPNV. The conclusion of some authors that birnavirus VP3 binds genomic dsRNA independently of the RNA sequence (Kochan et al., 2003; Pedersen et al., 2007) seems to rule out this assumption; however, it is important to put into context that, as Kochan et al. (2003) explain, other factors must be necessary to confer specificity, and VP1 is the most likely candidate for that role. Therefore, the RNP complex VP1-VP3-RNA might be type specific, which would support our assumption that translation would select viral types among the progeny mainly depending on the translation efficiency of each mRNA in a specific cell system.

Could the previous hypothesis explain the complete displacement of one of the types, as observed in some coinfection assays? This is difficult to accept, mainly considering that all the tested viral types are replicative (in high titers) in single inoculations in any of the cell lines used. Therefore, an alternative and/or complementary mechanism must exist.

iii) Genome segments association, RNP construction and RNPs cross-inhibition.- The association between segments has been reported to explain why certain reassortants occur more frequently than others (Nibert et al., 1996, form reovirus; Nomikou et al., 2015, for

bluetongue virus). A certain association between both segments seems to exist also in IPNV; however, it can hardly explain the complete displacement of one or several viral types from the progeny (due to the complete displacement of one type of one or both segments). An additional mechanism to explain non-random reassortment was reported by Jaru-ampornpan et al. (2014): in a coinfection with types A and B of influenza virus, the type B nucleoprotein (BNP) interacts with ANP, hindering its proper formation, thereby impairing the replication and production of type A influenza; but this RNP cross-inhibition effect could be partially relieved by overexpressing ANP. Based on the observations by Gavazzi et al. (2013) on the existence of interactions between the genomic segments of the influenza virus, which regulate preferential co-packaging, Gerber et al. (2014) stated that reassortment between distantly related viruses would be disfavoured. Similar observations have been made in the present study. In fact, to elucidate if reassortment was more facilitated among phylogenetically related types than among distantly related ones, as reported by Gavazzi et al. (2013) for the influenza virus, new coinfections were performed introducing new IPNV strains, the Canadian C3 reference strain, more related to the American WB strain than to the European Sp and Ab (Blake et al., 2001). Our results demonstrated this hypothesis, because in the coinfection between C3 and either European strains, C3 displaced the European type, and reassortants were represented in a very low or relatively low frequency. However, in the coinfection assay among C3 and WB, the results obtained were the opposite, as one reassortant appeared in a very high percentage.

Would interactions between heterologous IPNV proteins (VP1 of type 1 interacting with type 2 VP3) inhibit the capture and/or replication of a specific segment type? This cross-inhibition would also match with a non-random reassortment. Nevertheless, although this hypothesis is really attractive, it would be speculative to use it to explain our results without previously demonstrating the existence of those mechanisms also in birnavirus.

Finally, we wanted to know if reassortment could be a mechanism of adaptation to different species, and to answer this question, the same clones were used to challenge salmon and sole fry. The first interesting result was that WB and Sp clones, supposedly highly virulent to salmon, showed extremely low or no virulence for both species, probably due to the large number of passages through cell culture that the original wild type strains have undergone in our laboratory. In fact, the WB type isolate 19G4 –with less than 10 passages through cells– did demonstrate to be highly virulent for both species. On the other hand, the Ab clone (like the Ab-type isolate 20G3) did show high or very high virulence for sole and salmon, respectively. The remarkable result from the *in vivo* assays was that 2 reassortant clones stood out from the rest of the types given that they showed moderate virulence (20–30% cumulative mortality), and that they share a similar characteristic: a genome consisting of a segment from a non-virulent type (Sp) and the virulent one Ab. Something similar has been reported for IBDV natural reassortants of high virulence, which were demonstrated to have been produced from the reassortment between a segment B of a very virulent strain and a segment A of an attenuated one (Wei et al., 2006). Some authors stated that reassortment of segment B could have been the reason for the expansion of IBDV by the enhancing of its virulence. To this regard, we must say that all the natural reassortants that our group has reported were isolated from asymptomatic fish in different wild fish populations, which suggests that the virulence modulation of the virus through reassortment would have helped the virus to reach a balance with its host. However, the raising of highly virulent types from reassortment also in aquabirnaviruses cannot be ruled out. The results from the *in vivo* assays, in addition, suggest that,

aside from reassortment, other mechanisms must influence the virulence of IPNV in fish, as recently indicated by Lago et al. (2016).

In conclusion, reassortment in aquabirnaviruses is a process that provides the virus with a capacity to adapt to new hosts due to the diversity of viral types that are generated among the viral population. Furthermore, this phenomenon is far from a random process, and is cell-dependent perhaps by means of selective efficiency of recognition between the different types of viral mRNA and the specific cell ribosomes, and probably viral-dependent through segment interactions and/or RNP cross-inhibition; however, the precise mechanisms involved –reported for other viruses– need to be further demonstrated to exist also in birnaviruses.

4. Materials and methods

4.1. Cell lines, viral strains and viral titration

Monolayers of BF2 cells (bluegill caudal trunk; ECACC 21712) and CHSE-214 (Chinook salmon embryo; ATCC CRL1681) were grown at 20 °C and 15 °C respectively, in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Propagation of the virus was performed in 25 cm² flasks with confluent cell monolayers. When we realized that the BF-2 clone we had used in the first assays was an old one (more than 200 passages), it was called BF-2[old], and a new one (BF-2[new]), purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC), was employed in order to compare the results obtained with both clones.

For the coinfection assays, the three most traditionally studied IPNV reference strains were used: the American West Buxton (WB) and the two European strains Abild (Ab) and Sjarup (Sp); in addition, the Canada 1 (C1) strain was used due to its high relatedness to WB. On the other hand, for the *in vivo* assays, the strains 19G4 (WB type), 20G3 (Ab type) and 20G7 (a WB/Ab [segments A/B] reassortant), isolated from beaked redbfish (*Sebastes mentella*) in the Flemish Cap fishery (Romero-Brey et al., 2009), were also employed.

Titration of the virus was performed in 96 well plates with confluent monolayers of BF-2 or CHSE-214 cells using the endpoint dilution method. After 10 days of incubation at 15 °C, the titers were calculated by the Reed and Muench method (1938).

4.2. Reassortment in vitro

All co-infections were performed with pairs of reference strains at a multiplicity of infection (MOI) between 0.01 and 0.1 virus/cell, in 25 cm² monolayers of CHSE-214 or BF-2 cells. Four sets of experiments were performed:

A) CHSE-214 cells/Sanger sequencing.- Co-infections in CHSE-214 cells were performed between strains Ab and WB (Ab:WB), Ab and Sp (Ab:Sp), and Sp and WB (Sp:WB) at a ratio of 1:1 (equal viral titers); another assay, between strains Ab and WB, was carried out at a ratio of 1:2 (Ab:2WB). After CPE was observed, the viral suspension was collected and subjected to cloning by the endpoint dilution method in 48 well plates with semiconfluent monolayers of the same cell line (50 replicas per dilution). After 10 days of incubation at 15 °C, the highest dilution of each replica showing CPE was harvested and subjected to sequencing by the Sanger method. For that purpose, total RNA extraction was applied using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Synthesis of cDNA from both genomic segments was carried out with the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). PCR was performed using the commercial kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega). For segment A, the primers described by Heppell et al. (1992), were used: 5' AGAGACTACTGACTTCACAAGTGAC 3'(forward) and 5'

TGTGCACCACAGGAAAGATGACTC 3'(reverse). For segment B, we designed the primers 5' GAATCCMAACAAGACTCC 3'(forward) and 5' CACCATTGATAGYARTAGG 3'(reverse) at positions 643 and 1105 respectively, in the genome sequence of the Jasper strain (M58756). The amplified products were run in 2% agarose gels, visualized with Red Safe (iNtRON Biotechnology), and recovered from the gel using Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel). Sequencing of the purified fragments was performed by means of the dideoxi method (Sanger method), using the commercial kit Genome Lab™ DTCS-Quick Start (Beckman) following the manufacturer's instructions and a CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman) sequencer. Sequences were analyzed using SeqMan and MegaAlin (Lasergen) software.

- B) BF-2[old] cells/Sanger sequencing.- Co-infections were carried out with an old clone of BF-2 cells at ratios 1:1 (Ab:WB, Ab:Sp and Sp:WB), 1:2 (Ab:2Sp) and 2:1 (2Ab:WB and 2Sp:WB); the progeny was cloned and sequenced using the Sanger method as described above.
- C) BF-2[new] cells/Sanger sequencing.- Six co-infections were performed in a new clone of BF-2 cells at a ratio 1:1 (Ab:WB, Ab:Sp, Sp:WB, Ab:C1, WB:C1 and Sp:C1), and the progeny was cloned and sequenced by the Sanger method as indicated.
- D) BF-2[new] cells/Illumina sequencing.- In a second set of assays in the same cell line, the same six coinfections were performed, but when the monolayers were completely lysed, the crude virus was subjected to sequencing using the MiSeq sequencing system based on the generation of Illumina libraries (Sistemas Genómicos Service). For this purpose, the following primers were employed: 5' AAAGGCATGGGGCTGGAGAG 3'(forward) and 5' TGTGCACCACAGGAAAGATGACTC 3'(reverse), for segment A at positions 1439 and 1761 in the Jasper strain sequence (M18049), and f 5' GAATCCMAACAAGACTCC 3'(forward) and 5' GTAGGGTAGGCCGGCTGAGGACTT 3'(reverse) for segment B at positions 643 and 853 in the Jasper strain sequence (M58756). All primers used for Illumina sequencing were labelled with a specific tail (added at the 5' end): 3'TCGTCGGCAGC GTCAGATGTGTATAAAGAGACAG 5' for forward primers and 3'GTCTCGTGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAG 5' for reverse.

4.3. Statistical analysis

The distribution (in percentages) of segments A and B types observed in each assay were compared with the expected values (deduced as indicated at Results) applying the Chi-square test (χ^2) using GraphPad Prism vs 7.0a (GraphPad Software, La Jolla California USA).

4.4. Differential replication in vitro

From the first 2 experiments, clones corresponding to 3 different reassortants (WB/Ab, Ab/Sp and WB/Sp) and the wild types (Ab, Sp and WB) were selected to evaluate their infectivity in cell lines. Each single clone (6 replicas per clone) was inoculated at a MOI between 0.01 and 0.1 in 48 well plates of the corresponding cell line (the same used in the co-infection). After 1 h of adsorption, the remaining inoculum was removed and maintained at –20 °C until titration. The monolayers were covered with EMEM, and the plates incubated at the corresponding temperature and visualized on a daily basis for CPE detection. When CPE was developed, the crude virus was removed and maintained at –20 °C until titration. At the end of the assay, three sets of titration were performed as described above: i) the original inoculum (six replicas), ii) the remaining inoculum from each of the 6 inoculated wells (non-adsorbed virus), and iii) the crude virus recovered from the 6 wells.

4.5. Differential virulence *in vivo*

The *in vivo* infectivity of the same *in vitro* tested clones was assessed in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles of around 2 g, and Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry averaging 7 cm [Challenges I]. For comparative purposes, the infectivity of viral isolates from wild fish was also tested in both fish species [Challenges II]. All fish were obtained from commercial fish farms that have been monitored by our laboratory for years, and are declared virus free. The fish were acclimatized for at least 7 days. Fish were maintained at a maximum density of 100 fish per 100 l aquaria with aeration and were fed with a commercial diet. Prior to experimental infections, they were tested by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) and nested-PCR to confirm the absence of IPNV, viral nervous necrosis virus (VNNV), viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). Fish were challenged by intramuscular injection (i.m.) with 0.1 ml of virus (10^5 TCID₅₀/fish) and control fish received an injection of culture medium. Mortalities and clinical signs were recorded daily and dead fish were removed from the tanks. The surviving fish were killed with an overdose of MS-222 (Sigma). Dead fish were stored at -80°C until virological analysis was performed.

4.5.1. Challenges I

To test the infectivity *in vivo* of clones WB, Sp and Ab (wild types), and WB/Ab, Ab/Sp and WB/Sp (reassortants), 260 salmon fry and 200 sole fry were used. A total of 40 salmon and 30 sole were challenged with each virus and 20 fish of each species were used as a control group. Fish were maintained at 15°C for a maximum of 30 and 40d (sole and salmon, respectively).

4.5.2. Challenges II

For comparative purposes, the following strains isolated by our group in the Flemish Cap (Romero-Brey et al., 2009) were assayed in both fish species (200 salmon and 170 sole fry): the natural reassortant 20G7 (WB/Ab type), and the wild types 19G4 (WB type) and 20G3 (Ab type), all of them isolated from beaked redfish (*Sebastes mentella*). Sixty salmon and 50 sole were i.m. injected with each virus. As a control group, 20 fish of each species were i.m. injected with culture medium. Fish were maintained at 15°C for a maximum of 35 or 45d (salmon and sole, respectively).

4.6. Ethics statement

All animals were handled in strict accordance with good animal welfare practices, as defined by the European Union guidelines for the handling of laboratory animals (directive 2010/63/UE). The protocol was approved by the Galician Experimental Animal Welfare Committee and by the Xunta de Galicia (Permit Id. 15004/13/002). All efforts were made to minimize animal suffering. Temperature, lighting and noise were strictly controlled in order to minimize stress.

4.7. Viral detection from fish samples

Sampled fish were pooled in sets of 5 individuals. In the case of salmon, heart, kidney, spleen and head were aseptically extracted; in the case of sole, the whole fish (except the tail) was used. The samples were disrupted and the homogenates were diluted 1:10 (w:v) in Earle's balanced salt solution supplemented with 1000 IU penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 500 µg/ml gentamycin and 10 µg/ml amphotericin. After centrifugation at 7,500g for 15 min at 4°C , the supernatants were incubated during 24 h at 4°C , and then stored at -80°C until use.

For the RT-PCR detection of the viral genome directly in the fish tissues, total RNA extraction was performed using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The cDNA

synthesis was carried out with the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). PCR and Nested PCR were carried out using the commercial kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega), using primers 5' AGAGATCACTGACTTCACAAAGTGAC 3'(forward) and 5' TGTGCACCACAGGAAGATGACTC 3'(reverse) for PCR (Heppell et al., 1992) and 5' AAAGCATGGGGCTGGAGAG 3'(forward) and 5' CTCGGCTTGCCAGGACTC 3'(reverse) for nested PCR at positions 1439 and 1718 respectively, in the genome sequence of the Jasper strain (M18049). The amplified products were run in 2% agarose gels and visualized with Red Safe (iNtron Biotechnology).

For isolation in cell culture homogenate supernatants were diluted 1:10 and 1:100 (3 replicas per dilution) and inoculated in 48 well plates with semiconfluent BF-2 monolayers. Plates were incubated at 15°C and daily visualized to detect CPE. After 10 days, a new passage was applied and after two positive passages, the presence of IPNV was confirmed by RT-PCR.

Acknowledgements

We want to thank David Pazos for providing with the algorithm to calculate the distribution of viral types among the progeny from the percentages percentages of genomes types determined by sequencing with Illumina Libraries. This study was initially supported by Grant AGL2006-09388/ACU, from the Ministerio de Educación y Ciencia-Proyectos de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico-Programa Recursos y Tecnologías Agroalimentarias.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.virol.2016.11.003.

References

- Bahar, M.W., Peter Sarin, L., Graham, S.C., Pang, J., Bamford, D.H., Stuart, D.I., Grimes, J.M., 2013. Structure of a VP1-VP3 complex suggests how birnaviruses package the VP1 polymerase. *J. Virol.* 87, 3229–3236. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02939-12>.
- Baker, S.F., Nogales, A., Finch, C., Tufty, K.M., Domin, W., Perez, D.R., et al., 2014. Influenza A and B virus intertypic reassortment through compatible viral packaging signals. *J. Virol.* 88, 10778–10791. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01440-14>.
- Bandín, I., Souto, S., Cutrin, J.M., López-Vázquez, C., Oliveira, J.G., Esteve, C., et al., 2014. Presence of viruses in wild eels *Anguilla anguilla* L. from the Albufera Lake (Spain). *J. Fish Dis.* 37, 597–607. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.1392>.
- Blake, S., Ma, J.Y., Caporale, D., Jairath, S., Nicholson, B.L., 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Organ* 45, 89–102. <http://dx.doi.org/10.3354/dao045089>.
- Calvert, J.G., Nagy, E., Soler-M, Dobos, P., 1991. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 72, 2563–2567. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-72-10-2563>.
- Coetzee, P., Van Vuuren, M., Stokstad, M., Myrland, M., van Gennip, R.G.P., van Rijn, P.A., Venter, E.H., 2014. Viral replication kinetics and *in vitro* cytopathogenicity of parental and reassortant strains of bluetongue virus serotype 1, 6 and 8. *Vet. Microbiol.* 171, 53–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.006>.
- Cohen, J., Poinsard, A., Scherrer, R., 1973. Physico-chemical and morphological features of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Gen. Virol.* 21, 485–498. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-21-3-485>.
- Cutrin J.M., Lago M., Bandín I., Areoso E., Dopazo C.P., 2010. Phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from wild fish in the Galician coastal waters (NW Spain). In: Proceedings of the 8th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. Santiago Compostela, Spain. ISBN: 978-84-693-1562-0.
- Devold, M., Karlsen, M., Nylund, A., 2006. Sequence analysis of the fusion protein gene from infectious salmon anemia virus isolates: evidence of recombination and reassortment. *J. Gen. Virol.* 87, 2031–2040. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.81687-0>.
- Dobos, P., 1977. Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 21, 242–258. (WOS:A1977CR47100027).
- Dobos, P., 1995a. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu Rev. Fish Dis.* 5, 25–54. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(95\)00003-8](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(95)00003-8).
- Dobos, P., 1995b. Protein-primed RNA synthesis *in vitro* by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 208, 19–25. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1995.1125>.

- Duncan, R., Nagy, E., Krell, P.J., Dobos, P., 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Gen. Virol.* 61, 3655–3664. (WOS:A1987KX50300002).
- Duncan, R., Mason, C.L., Nagy, E., Leong, J.A., Dobos, P., 1991. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp motif. *Virology* 181, 541–552. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90887-4](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(91)90887-4).
- Ferreto, D., Garriga, D., Navarro, A., Rodriguez, J.F., Verdaguer, N., 2015. Infectious Bursal disease virus VP3 upregulates VP1-mediated RNA-dependent RNA replication. *J. Virol.* 89, 11165–11168. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00218-15>.
- Gavazzi, C., Yver, M., Isela, C., Smyth, R.P., Rosa-Calatrava, M., Linab, B., et al., 2013. A functional sequence-specific interaction between influenza A virus genomic RNA segments. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 110, 16604–16609. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1314419110>.
- Gerber, M., Isel, C., Moutles, V., Marquet, R., 2014. Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol.* 22, 446–455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.001>.
- Greenbaum, B.D., Li, O.T.W., Poon, L.L.M., Levine, A.J., Rabadan, R., 2011. Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 109, 3341–3346. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113300109>.
- Hara, K., Nakazono, Y., Kashiwagi, T., Hamada, N., Watanabe, H., 2013. Co-incorporation of the PB2 and PA polymerase subunits from human H3N2 influenza virus is a critical determinant of the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes. *J. Gen. Virol.* 94, 2406–2416. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.01053959-0>.
- Heppehl, J., Berthiaume, L., Tarrah, E., Lecomte, J., Arella, M., 1992. Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.* 73, 2863–2870. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-73-11-2863>.
- Heppehl, J., Tarrah, E., Lecomte, J., Berthiaume, L., Arella, M., 1995. Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of Infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 214, 40–49. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1995.9956>.
- Hon, C.C., Lam, T.Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y.F., Yip, C.W., et al., 2006. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J. Virol.* 80, 8503–8509. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00585-06>.
- Jaru-ampornpan, P., Narkpuk, J., Wanitchang, A., Jongkaewwattana, A., 2014. Nucleoprotein of influenza B virus binds to its type A counterpart and disrupts influenza A viral polymerase complex formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 296–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.110>.
- Jorba, N., Juárez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., Zamareno, N., Albar, J.P., Ortin, J., 2008. Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8, 2077–2088. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200700508>.
- Kasanga, C.J., Yamaguchi, T., Munang'andu, H.M., Ohya, K., Fukushi, H., 2013. Genomic sequence of an infectious bursal disease virus from Zambia: classical attenuated segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A. *Arch. Virol.* 158, 685–689. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-012-1531-4>.
- Kirsanovs, S., Klempa, B., Franke, R., Lee, M.H., Schönrich, G., Rang, A., Kruger, D.H., 2010. Genetic reassortment between high-virulent and low-virulent Dobeava-Belgrade virus strains. *Virus Genes* 41, 319–328. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-010-0523-2>.
- Kochan, G., Gonzalez, D., Rodriguez, J.F., 2003. Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 148, 723–744. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0949-5>.
- Lago, M., Rodríguez, J.F., Bandin, I., Dopazo, C.P., 2016. Aquabornavirus polyplody: a new strategy to modulate virulence? *J. Gen. Virol.* 97, 1168–1177. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000434>.
- Lago, M., Bandin, I., Barja, J.L., Rodríguez, J.F., Dopazo, C.P., 2010. Virulence for cultured turbot and Senegalense Sole of aquatic birnaviruses from wild fish: analysis of factors of virulence. In: *Proceedings of the 8th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates*. Santiago Compostela, Spain. ISBN: 978-84-693-1562-1560.
- Lago, M., Crujeiras, A., Bandin, I., Dopazo, C.P., 2013. Ex vivo reassortment between IPNV strains. In: *EAFP Proceedings of the 16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*, 2013.09.02–2013.08.06, Tampere. Available at: <http://real.mtak.hu/17057/1/EAFP%202013%20abstracts%20book.pdf>.
- Lago, M., Cutrin, J.M., Casas, M., Bandin, I., Dopazo, C.P., 2014. A diversity study of aquabornavirus isolates from wild fish from Flemish Cap fishery. In: *Proceedings of the 9th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates*. Málaga, Spain. ISBN: 978-84-693-1562-0.
- Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., et al., 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* 87, 209–216. (WOS:000234647800022).
- Lighner, D., Post, G., 1969. Morphological characteristics of infectious pancreatic necrosis virus in trout pancreatic tissue. *J. Fish. Res. Board Can.* 26, 2247–2250. (WOS:A1969D940000029).
- Lombardo, E., Maraver, A., Caston, J.R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., Rodriguez, J.F., 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73, 6973–6983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112783/>.
- Lu, Z., Zhang, L., Wang, N., Chen, Y., Guo, L., Wang, Y., et al., 2015. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in Northern China. *Virus Res.* 203, 92–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.04.003>.
- Lubeck, M.D., Palese, P., Schulman, J.L., 1979. Non random association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology* 95, 269–274. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90430-6](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(79)90430-6).
- Magyar, G., Dobos, P., 1994. Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* 204, 580–589. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1994.1572>.
- Maraver, A., Ona, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J.A., Caston, J.R., Pazos, F., Rodriguez, J.F., 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* 77, 6438–6449. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.11.6438-6449.2003>.
- McDonald, S.M., Aguayo, D., Gonzalez-Nilo, F.D., Patton, J.T., 2009. Shared and group-specific features of the rotavirus RNA polymerase reveal potential determinants of gene reassortment restriction. *J. Virol.* 83, 6135–6148. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00409-09>.
- Moreno, P., Oliveira, J.G., Labella, A., Cutrin, J.M., Baro, J.C., Borrego, J.J., Dopazo, C.P., 2014. Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6560–6571. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02090-14>.
- Muller, H., Nitschke, R., 1987. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* 159, 174–177. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90363-1](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(87)90363-1).
- Nagata, K., Kawaguchi, A., Naito, T., 2008. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev. Med. Virol.* 18, 247–260. (WOS:000258040200094).
- Niëbert, M.L., Margraf, R.L., Coombs, K.M., 1996. Nonrandom segregation of parental alleles in reovirus reassortment. *J. Virol.* 70, 7295–7300. (WOS:A1996VG1270010).
- Nikolakaki, S.V., Nomikou, K., Koumbati, M., Mangana, O., Papanastassopoulou, M., Mertens, P.P.C., Papadopoulos, O., 2005. Molecular analysis of the NS3/NSA gene of Bluetongue virus isolates from the 1979 and 1998–2001 epizootics in Greece and their segregation into two distinct groups. *Virus Res.* 114, 6–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2005.05.004>.
- Nomikou, K., Hughes, J., Wash, R., Kellam, P., Breaud, E., Zientara, S., et al., 2015. Widespread reassortment shapes the evolution and epidemiology of bluetongue virus following european invasion. *PLoS Pathog.* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005056>.
- Ohashi, S., Matsumori, Y., Yanase, T., Yamakawa, M., Kato, T., Tsuda, T., 2004. Evidence of an antigenic shift among Payam serogroup orbiviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4610–4614. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.10.4610-4614.2004>.
- Oliveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Thierry, R., Barja, J.L., Bandin, I., 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.* 90, 2940–2951. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0103912-0>.
- Park, J.G., Kim, D.S., Matthijssens, J., Kwon, H.J., Zeller, M., Alfajaro, M.M., et al., 2014. Comparison of pathogenicities and nucleotide changes between porcine and bovine reassortant rotavirus strains possessing the same genotype constellation in piglets and calves. *Dev. Microbiol.* 172, 51–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devmic.2014.04.010>.
- Pedersen, T., Skjævel, A., Jørgensen, J.B., 2007. VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interacts with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA. *J. Virol.* 81, 6652–6663. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02831-06>.
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J.C., Palero, F., González-Candelas, F., 2014. Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect. Genet. Evol.* 30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.inev.2014.12.022>.
- Plarre, H., Nyhnd, A., Karlens, M., Brevik, O., Saether, P.A., Vike, S., 2012. Evolution of infectious salmon anaemia virus (ISA virus). *Arch. Virol.* 157, 2309–2326. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-012-1438-0>.
- Ranig, R.F., 1997. Genetics of the rotaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 225–255. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.225>.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.
- Romero-Brey, I., Bandin, I., Cutrin, J.M., Vakharia, V.N., Dopazo, C.P., 2009. Genetic analysis of aquabornaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 32, 585–595. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01020.x>.
- Santi, N., Vakharia, V.N., Evensen, O., 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322, 31–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.016>.
- Simon-Loriere, E., Holmes, E.C., 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 617–626. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2614>.
- Tacken, M., Peeters, B.P.H., Thomas, A.A.M., Rottier, P.J.M., Boot, H.J., 2002. Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.* 76, 11301–11311. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.22.11301-11311.2002>.
- Tacken, M.G.J., Rottier, P.J.M., Gielkens, A.L.J., Peeters, B.P.H., 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase. *VP1 J. Gen. Virol.* 81, 399–408. (WOS:000084632500024).
- Tacken, M.G.J., Thomas, A.A.M., Peeters, B.P.H., Rottier, P.J.M., Boot, H.J., 2004. VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Arch. Virol.* 149, 2245–2260. <http://dx.doi.org/10.1007>

- s00705-004-0365-0.
- Toffolo, V., Negrisola, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., Dalla Valle, L., 2007. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 298–308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.003>.
- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L., Yu, L., 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 277–287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.040>.
- Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H., Yu, X., Yu, L., 2008. Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 131, 279–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.08.013>.
- Wong, K.K.Y., Bull, R.A., Stelzer-Braid, S., Fennell, M., Rawlinson, W., 2011. Effect of reassortment on the nucleotide and amino acid changes of human A/H3N2 RNP subunits during 1998–2009. *J. Clin. Virol.* 51, 266–271.
- Yamaguchi, T., Ogawa, M., Miyoshi, M., Inoshima, Y., Fukushi, H., Hirai, K., 1997. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 142, 1441–1458.

